HALIOTIS



premier colloque international de pathologie et parasitologie des mollusques

1979 - Vol. 8

PERPIGNAN (FRANCE) 9-12 SEPT. 1977

LABORATOIRE DE PATHOLOGIE COMPAREE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC, MONTPELLIER
I.N.R.A. - C.N.R.S., ST CHRISTOL
DIR.: C. VAGO

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE
UNIVERSITE, PERPIGNAN
DIR.: C. COMBES

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE



N° ISSN0397.765 X

SOCIETE FRANCAISE DE MALACOLOGIE

fondée en 1969

SIEGE SOCIAL : 55, rue de Buffon, 75005 PARIS - Tél. 331-38-95

La Société Française de Malacologie a été fondée le 29 janvier 1969. Elle a pour but d'encourager et de développer toute étude concernant les Mollusques actuels et fossiles, de faciliter les relations entre les malacologistes et de les documenter sur les recherches en cours dans les différents laboratoires de France ou d'autres pays. L'association est dirigée par un Conseil d'Administration de douze membres élus pour trois années par l'Assemblée Générale ordinaire.

Les demandes d'adhésion sont ratifiées par le Conseil d'Administration ; aucune condition particulière n'est exigée pour être membre, personne physique ou personne morale. Le montant annuel de la cotisation sera, à partir de 1979, de 75 F pour les personnes physiques (non étudiants), 50 F pour les étudiants, 100 F pour les personnes morales (Laboratoires, Bibliothèques, Librairies, Sociétés...), 10 F pour le bulletin "ELONA". Les demandes des anciens numéros d'Haliotis sont fixées à 100 F.

Chaque membre de la Société reçoit : 1°) la revue "HALIOTIS" (1 volume de 1 ou 2 numéros, séparés ou reliés, par an). 2°) le bulletin "ELONA (1 numéro par an). 3°) des circulaires d'informations. 4°) des circulaires bibliographiques (travaux malacologiques reçus au Siège social de la S.F.M.

Toute demande d'adhésion ou de renseignements doit être adressée au Secrétariat de la Société.

Directeur de la publication : le Président de la S.F.M.

Secrétaire de rédaction et Gérant du volume : Nardo VICENTE

Imprimé à Marseille
Faculté des Sciences et Techniques
St-Jérôme - 13013 Marseille

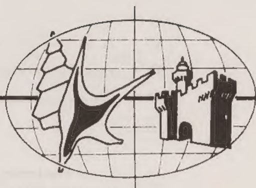
Dépôt légal : 4è Trimestre 1979

1979 - Vol.0

premier colloque international de pathologie et parasitologie des mollusques

PERPIGNAN (FRANCE) 9-16 SEPT. 1977

SOCIETE FRANCAISE DE MALACOLOGIE



1979 - Vol. 8

premier colloque international de pathologie et parasitologie des mollusques

PERPIGNAN (FRANCE) 9-12 SEPT. 1977

LABORATOIRE DE PATHOLOGIE COMPAREE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC, MONTPELLIER
I.N.R.A. - C.N.R.S., ST CHRISTOL
DIR.: C. VAGO

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE
UNIVERSITE, PERPIGNAN
DIR.: C. COMBES

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE



N° ISSN0397.765 X

S O M M A I R E

Section : MOLLUSQUES VECTEURS

Section : PHYSIOPATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Section : PATHOLOGIE

PROGRAMME GENERAL DU COLLOQUE

VENDREDI 9 SEPTEMBRE

Matin

Allocution du Président de la Société Française de Malacologie : Prof. W. STREIFF.

Allocution du représentant du Centre Universitaire de Perpignan : Prof. C. COMBES.

Introduction du Colloque par le Prof. C. VAGO, membre de l'Institut, Président du Colloque.

Séance de communication et de discussions : Président de séance : T.C. CHENG (U.S.A.).

Section PARASITISME
Communications de R. ORMIERES ; P. Van BANNING ; J. MAURAND et C. COMBES ; R. ORMIERES et H. GRIZEL.

Après-midi

Séance de communications et de discussions : Président de séance : Y.J. GOLVAN (France).

Section PARASITISME (suite)
Communications de J.S. BUCHANAN ; E. SCHOLTYSECK ; P.H. WOLF ; S. DEBLOCK ; M. DALMAS et R. LLOZE ; J. LLEWELLYN ; E. HIS ; J.F. MANIER et G. BOUIX.

Soir

Visite d'une cave de Vins doux de Rivesaltes à Pollestres.

SAMEDI 10 SEPTEMBRE

Matin

Séance de communications et de discussions : Président de séance : J. LLEWELLYN (Grande-Bretagne).

Section MOLLUSQUES VECTEURS.
Communications de L. EUZET ; C. GABRION et J.JOURDAN ; Y.J. GOLVAN , C. COMBES, J.EUZEBY, B. SALVAT ; J.P. POINTIER , H. NASSI et A. DELPLANQUE; H. NASSI ; J.P. POITIER ; J.Y. GOLVAN et S. SEYTOR ; A. THERON ; W. PFLUGER; J. JOURDAN.

Réunion du Bureau de la Société Française de Malacologie.

Après-midi

Séance de communications et de discussions : Président de séance : E. SCHOLTYSECK (All. Féd.).

Section MOLLUSQUES VECTEURS (suite).
Communications de G. ROBART ; G.MANDAHL-BARTH et C. RIPERT ; H. CHEVALLIER ; Y. MANGA GONZALEZ et M. CORDERO DEL CAMPILLO ; A. DELAGE et R. BOSC ; Présentation d'affiches de recherches : B. BOURGAT, S. D. KULO et S. AGBALO.

Section PHYSIOPATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE
Communications de T.C. CHENG ; J.A. COUCH ; J. BENEX.

Soir

Visite de l'Atelier de Céramiques et Tapisseries, San Vicens.

DIMANCHE 11 SEPTEMBRE

Matin

Séance de communications et de discussions : Président de séance : M. CADI -SOUSSI (Maroc).

Section PHYSIOPATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE (suite)
Communications de J. LE BRETON ; J.C. HARSHBARGER , S.V. OTTO et SING CHEN CHANG ; J.A. COUCH et J.T. WINSTEAD.

Section PATHOLOGIE

Communications de G. MEYNADIER ; A.R. MEAD ; G. MEYNADIER, A. AMARGIER et A. VEY ; J.R. BONAMI ; J.D. BRIGGS et A.A. ARATA ; S. V. OTTO, J.C. HARSHBARGER et SING CHEN CHANG, Présentation d'affiches de recherches D. PRIEUR.

Après-midi

Séance de communications et de discussions ; Président de séance : E. BRYGOO (France).

Section PATHOLOGIE (suite)
Communications de B.J. HILL et D.J. ALDERMANN ; M. COMPS et J.L. DUTHOIT ; J.S. BUCHANAN ; M. COMPS ; G. TIGE ; J.L. DUTHOIT et H. GRIZEL ; G. BALOUET ; A. CAHOUR et C. CHASTEL ; H. GRIZEL et G. TIGE ; F. COUSSERANS ; J. LE BRETON.

Séance de films de recherches.

Clôture du Colloque par Prof. C. VAGO, président du Colloque.

Soir

Banquet du Colloque, Hôtel Majorca, Perpignan.

LUNDI 12 SEPTEMBRE

Excursion sur la Côte Vermeille : Elne, Collioure.
Banyuls : Laboratoire d'Ecologie du Mas de la Serre.

LISTE DES PARTICIPANTS

ALGERIE

DAUMAS M., Institut de Biologie, Université d'Oran,
ORAN - ES SENIA.

KECHEMIR N., Institut de Biologie, Université d'Oran,
ORAN - ES SENIA.

LE PAGE J.Y., Laboratoire de Biologie, Université,
ALGER.

LLOZE R., Institut de Biologie, Université d'Oran,
ORAN - ES SENIA.

MARTINEZ J.C., Institut de Biologie, Université d'Oran,
ORAN - ES SENIA.

YOUSFI A., Institut de Biologie, Université d'Oran,
ORAN - ES SENIA.

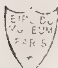
ALLEMAGNE FEDERALE

PFLÜGER W., Institut für Medizinische Parasitologie,
D - 5300 BONN - VENUSBERG.

SCHOLTYSECK E., Abteilung für Protozoologie, Zoologisches
Institut der Universität, Poppelsdorfer Schloss
D - 5300 BONN.

AUSTRALIE

WOLF P.H., New South Wales State Fisheries, Scientific
Section, P.O. Box N 211 - Grosvenor Street,
SYDNEY 2000.



REPUBLIQUE POPULAIRE DU BENIN

DOSSOU C., Laboratoire de Zoologie, Université Nationale du Bénin, B.P. 526, COTONOU.

REPUBLIQUE UNIE DU CAMEROUN

DUPOUY J., Faculté des Sciences, B.P. 812, YAOUNDE.

RIPERT C., Centre Universitaire des Sciences de la Santé, B.P. 1364, YAOUNDE.

CHILI

RAMIREZ-PEREZ E., Ecole Vétérinaire, Université du Chili, SANTIAGO DU CHILI

ESPAGNE

CERUINO EIROA A., Plan de Exploitacion Marisquera de Galicia Villanueva de Arosa, PONTEVEDRA.

FIGUERAS A., Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Laboratorio de Vigo, Muelle de Bouzas, VIGO.

GUERRERO VALERO S., Plan de Explotacion Marisquera de Galicia Villanueva de Arosa, PONTEVEDRA.

MANGA GONZALEZ Y., Laboratorio de Parasitologia, Facultades de Veterinaria y de Biologia, LEON.

MAS COMA S., Departamento de Parasitologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, BARCELONA.

MASSO BOLIBAR J., Instituto Espanol de Oceanografia, Avenida Orilla Mar 47, VIGO.

MONTOLIU I., Departamento de Parasitologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, BARCELONA.

FRANCE

AMARGIER A., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

BAIN O., Laboratoire de Zoologie - Vers, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 PARIS.

BALOUET G., Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Régional de Brest, 29279 BREST.

BARTOLI P., Laboratoire de Biologie Marine, Faculté des Sciences et Techniques St Jérôme, rue Poincaré, 13397 MARSEILLE.

BECHIER J.C., Faculté de Médecine, Avenue Kennedy Z.U.P. 30000 NIMES.

BENEX J., Service de Biochimie des Antigènes, Institut Pasteur, 20, rue Dr. Roux, 75015 PARIS.

BENHAMOU N., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

BERGOIN M., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

BOEMARE N., Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

BONAMI J.R., Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc 34060 MONTPELLIER.

BOUIX G., Laboratoire de Zoologie I, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

BRYGOO E., Muséum National d'Histoire Naturelle, 12, rue Buffon, 75005 PARIS.

CAMBON M., Laboratoire de Parasitologie, U.E.R. de Médecine et de Pharmacie, 63000 CLERMONT-FERRAND.

CHABAUD A., Laboratoire de Zoologie - Vers. Museum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 PARIS.

CHEVALLIER H., Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie, Museum National d'Histoire Naturelle, 55, rue Buffon, 75005 PARIS.

COMBES C., Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

COMPS M., Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes 34200 SETE.

FRANCE (suite)

COUSSERANS F., Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

CROIZIER G., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

DEBLOCK S., Laboratoire de Zoologie, Physiologie, Parasitologie U.E.R. de Pharmacie. 59045 LILLE.

DELAGE A., Faculté de Médecine, Avenue Kennedy, Z.U.P. 30000 NIMES.

DUFOUR C., Laboratoire de Zoologie - Vers, Museum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 PARIS.

DURETTE-DESSET M.C., Laboratoire de Zoologie - Vers, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 PARIS.

EUZET L., Laboratoire de Parasitologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

FOURNIER A., Département de Biologie Animale, Centre Universitaire 66025 PERPIGNAN.

GABRION C., Laboratoire de Parasitologie Comparée Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

GIANNOTTI J., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

GOLVAN Y.J., Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine St Antoine, 27, rue de Chaligny, 75571 PARIS.

GRIZEL H., Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes 12, rue des Résistants, 56470 LA TRINITE SUR MER.

GUELPA B., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS 30380 SAINT CHRISTOL.

HARANT H., Faculté de Médecine, Avenue Kennedy, Z.U.P. 30000 NIMES.

HERBERTS C., Laboratoire de Biologie Marine - Bât. A. Université de Paris VI, 75230 PARIS.

HIS E., Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes 63, boulevard Deganne, 33120 ARCACHON.

HOUIN R., Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 6, rue du Général Sarrail, 94000 CRETEIL.

HURPIN B., Station de Lutte Biologique I.N.R.A., La Minière 78000 VERSAILLES

JOURDANE J., Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

FRANCE (suite)

KNOEPFELER L.Ph., Laboratoire Arago,
66650 BANYULS SUR MER.

LAMBERT A., Laboratoire de Parasitologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc
34060 MONTPELLIER.

LE BRETON J., Laboratoire de Zoologie maritime, Université de Caen, 14530 LUC SUR MER.

LOUIS C. Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

MAILLARD C., Laboratoire de Parasitologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34060 MONTPELLIER.

MANIER J.F., Laboratoire de Zoologie I, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

MARQUES A., Laboratoire de Biologie Générale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

MARTIN Y., Fondation Scientifique Ricard, Île des Embiez,
83140 SIX FOURS.

MATZ G., Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, Boulevard Lavoisier 49045 ANGERS.

MAURAND J., Laboratoire d'Ichthyologie et de Parasitologie Générale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

MEYNADIER G., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

MEYNADIER S.,Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

NASSI H., Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

OLIVER G., Laboratoire de Biologie Générale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

ORMIERES R., Station Biologique, 34200 SETE.

PETAVY A.F., Laboratoire de Parasitologie, U.E.R. de Médecine et Pharmacie, 63000 CLERMONT FERRAND.

POINTIER J.P., Laboratoire de Biologie Marine et Malacologie, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 55, rue Buffon
75005 PARIS.

PREVOT G., Laboratoire de Biologie Animale et Ecologie, Faculté des Sciences et Techniques St Jérôme
rue Poincaré, 13397 MARSEILLE.

FRANCE (suite)

PRIEUR D., Laboratoire de Zoologie, Université de Bretagne Occidentale, 29269 BREST.

QUIOT J.M., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

REYSS D., Centre National pour l'Exploitation des Océans, 39, avenue d'Iéna 75116 PARIS.

RICHARD G., Laboratoire de Biologie Marine et Malacologie, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 55, rue Buffon 75005 PARIS.

RICHARD J., Laboratoire de Biologie Animale, Institut Le Bel, 4, rue Blaise Pascal, 67000 STRASBOURG.

ROGLES D., Tioxide S.A., B.P. 89, 62102 CALAIS.

STREIFF W., U.E.R. Sciences de la Vie, Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN.

TARDY J., Laboratoire de Biologie et Biochimie Marines, I.U.T. de la Rochelle, Rue de Roux 17026 LA ROCHELLE.

THERON A., Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66025 PERPIGNAN.

VAGO C., Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc 34060 MONTPELLIER et Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS 30380 SAINT-CHRISTOL.

VEY A., Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, 30380 SAINT CHRISTOL.

VIANEY-LIAUD M., Laboratoire de Zoologie I, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

VICENTE N., Laboratoire de Biologie Marine, Faculté des Sciences Université d'Aix-Marseille I, 13013 MARSEILLE.

VIVARES C.P., Laboratoire d'Ichthyologie et Parasitologie Générale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 MONTPELLIER.

GRANDE - BRETAGNE

BUCHANAN J.S., Unit of Aquatic Pathobiology, University of Stirling, STIRLING FK 9 4 LA. SCOTLAND.

GRANDE - BRETAGNE (suite)

HILL B., Fish Diseases Laboratory, WEYMOUTH, DORSET.

LLEWELLYN J., Department of Zoology and Comparative Physiology
The University of Birmingham P.O. Box 363
BIRMINGHAM B 15 2 TT.

INDE

GHOSH S.K., Dep. Sciences, University of New-Delhi,
NEW DELHI.

ITALIE

CANESTRI-TROTTI G., Ist. Malattie infettive, profilassi e
polizia veterinaria Via s. Giacoma 9/2.
BOLOGNA.

GALLONI M., Istituto di Patologia Generale ed Anatomia
Patologica Veterinaria, Universita di Torino
Via Nizza 52
10126 TORINO.

MAROC

CADI-SOUSSI M., Laboratoire de Parasitologie, Faculté
de Médecine, Université, RABAT.

NIGER

DIALLO B., Faculté des Sciences, Université,
NIAMEY.

PAKISTAN

HASAN S., CSIRO Biological Control Unit France.
30380 SAINT CHRISTOL.

PAYS - BAS

Van BANNING P., The Netherlands Institute for Fishery
Investigations, Haringkade 1
IJMUIDEN 1620.

ROUMANIE

PETRE Z., Institut de Recherches de Protection des Végétaux,
BUCAREST.

TOGO

BOURGAT R., Ecole des Sciences, Univeristé du Bénin
B.P. 1515, LOME.

U.S.A.

BRIGGS J.D., Ohio State University, 1735 Neil Ave.
COLUMBUS, OHIO 43210.

CHENG T.C., Institute for Pathobiology, Lehigh University
BETHLEHEM, PENNSYLVANIA 18015.

COUCH J.A., United States Environment Protection Agency,
Environmental Research Laboratory
GULF BREEZE, FLA. 32561.

HARSHBARGER J., Registry of Tumors in Lower Animals,National Museum
of Natural History,Smithsonian Institution.
WASHINGTON D.C. 20560.

MEAD A., Liberal Arts College 347, Modern Languages Bldg,
University of Arizona, TUCSON AZ 85721.

VENEZUELA

MEDINA E., Université de Caracas, CARACAS.

RAPPORTS
ET
COMMUNICATIONS

Haliotis, 8, 1977 (1979)
p. 19 à 23

INTRODUCTION PRESIDENTIELLE

PROBLEMES D'ACTUALITE ET ORIENTATIONS EN PATHOLOGIE ET PARASITOLOGIE DES MOLLUSQUES

par Constant Vago (*)

RESUME

L'analyse des étapes de l'évolution des recherches en pathologie et parasitologie des Mollusques permet de reconnaître un tournant actuel dont les motivations principales sont étudiées :

- En pathologie des Invertébrés, un retard considérable existe pour ce secteur par rapport à celui des Arthropodes.

- L'étude de l'évolution phylogénétique des relations hôte-pathogène, de l'immunité et des tumeurs est depuis peu reconnue essentielle pour la compréhension des problèmes de grande actualité.

- Le rôle des Mollusques en tant que vecteurs de maladies est considérable en épidémiologie et la lutte biologique est envisagée contre de tels vecteurs.

- Des anomalies des Mollusques aquatiques et marins sont des éléments essentiels de l'action des pollutions.

- L'étude des épizooties et des thérapeutiques est urgente pour la production des Mollusques marins ou terrestres comestibles.

Les possibilités de développement de programmes et de coopération sont dégagées en considérant chacun des aspects évoqués.

INTRODUCTION : PRESENT PROBLEMS AND ORIENTATIONS IN MOLLUSCAN PATHOLOGY AND PARASITOLOGY

SUMMARY

An analysis of the development of Molluscan Pathology and Parasitology leads to admit presently in this sector of researches a turning-point whose main causes are :

- A considerable delay in this sector of Invertebrate Pathology, comparatively to this of Arthropods.

- The study of the phylogenetical evolution of host-pathogen relationships, immunity, and tumors, is considered to be essentiel for the understanding of important problems in general pathology.

- Abnormalities observed in aquatic and marine Molluscs are basic factors for the evaluation of pollution.

- Molluscan vectors of human diseases play a great part in epidemiology and the biological control of those vectors is planed.

(*) Station de Recherches de Pathologie Comparée
Université des Sciences, 34060 Montpellier et
I.N.R.A.-C.N.R.S., 30380, Saint-Christol

- The study of epizootics and therapeutics is most urgently required for the production of eatable marine and terrestrial Molluscs.

The possibilities of the development of programmes and of co-operations are considered in regard to these different aspects.

° ° °

Ce premier Colloque international sur la pathologie et la parasitologie des mollusques semble correspondre à des intérêts multiples d'ordre scientifique et économique à juger au nombre, aux provenances et à la variété des spécialités des participants. Cette convergence d'intérêt se traduit aussi par les qualités et les positions des organismes nationaux et internationaux qui ont bien voulu lui accorder leur patronage : l'Organisation Mondiale de la Santé, le Centre National de l'Exploitation des Océans, l'Institut National de la Recherche Agronomique, l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes et la Fédération Nationale des Ostréiculteurs.

° ° °

Cet intérêt dont la présente réunion est une matérialisation s'explique si l'on analyse rapidement les grandes lignes de l'évolution de la pathologie et de la parasitologie des invertébrés, en particulier de celles des mollusques.

Dans cette évolution on peut nettement reconnaître des étapes successives.

Dès le milieu du dernier siècle, des anomalies, des ectoparasites crustacés et des endoparasites helminthes ou protozoaires ont été décrits à partir de divers mollusques, surtout marins. Toutefois, dans la plupart de ces descriptions l'aspect zoologique, voire systématique, prédomine comme cela est d'ailleurs le cas pour d'autres classes des invertébrés : insectes, arachnides, crustacés, échinodermes. Une masse considérable de données se trouve ainsi réunie au milieu de notre siècle contribuant largement à l'élaboration de la systématique actuelle des helminthes et des protozoaires et, dans une certaine mesure, à celle des champignons inférieurs. Les descriptions de tumeurs, de nature le plus souvent douteuse, sont restées pendant longtemps des curiosités peu expliquées. Enfin, les infections bactériennes furent à peine mentionnées et celles rickettsiennes et virales restèrent inconnues.

Pour toutes ces observations, les aspects relatifs à l'action pathogène ont à peine été abordés, encore moins expliqués et ceci sans aucun doute à cause de l'évolution, très lente à l'époque, de la pathologie des invertébrés en général et de la concentration des efforts dans cette discipline sur les insectes, en partie pour des raisons économiques.

Ce sont apparemment des motifs de même ordre qui ont fait apparaître très progressivement, au cours d'une deuxième pédiode, des travaux plus directement orientés vers les actions pathogènes et ceci essentiellement en milieu marin à l'occasion des grandes épizooties des huîtres de production. Des exemples bien connus en sont la "maladie du pied" en Europe et les infections à *Labyrinthomyxa* en Amérique. Par contre, chez les mollusques terrestres, dont la production intensive n'a pas encore été réalisée, les recherches pathologiques et parasitologiques sont restées presque inexistantes.

Ces recherches furent les signes précurseurs d'un véritable tournant que l'on peut dégager dans l'évolution de la discipline depuis une quinzaine d'années. Des travaux de ces domaines deviennent nombreux, des laboratoires spécialisés se créent et des organisations nationales et internationales s'intéressent au secteur.

o o o

En essayant de reconnaître les motifs et les circonstances de cet éveil d'intérêt, on pourrait peut-être non seulement comprendre la situation actuelle mais aussi saisir les voies d'avenir à suivre et à exploiter.

a) Si l'on considère d'abord les bases scientifiques, on doit avant tout être conscient de la progression extrêmement rapide des connaissances, depuis une trentaine d'années, en pathologie et parasitologie des invertébrés et de la cadence vertigineuse de la découverte de virus, de rickettsies, de bactéries ou de protozoaires pathogènes, de leur cycle, de leur action, des réactions d'immunité chez les invertébrés les plus divers. Toutefois, et ceci est un fait important pour la présente analyse, la grande majorité des résultats, surtout au début, ont été relatifs aux arthropodes, et avant tout aux insectes ; les recherches concernant les mollusques ont subi un retard considérable. Pourtant, on sait aujourd'hui, grâce aux travaux récents, que les mollusques constituent une source extrêmement riche d'affections pathologiques virales, rickettsiennes et parasitaires et représentent un système valable pour les études immunologiques. Les principes et les méthodes de recherches spécifiques ayant été préalablement élaborés chez d'autres invertébrés, de très grandes facilités s'offrent aujourd'hui et dans l'avenir pour leur application dans l'étude des mollusques.

Un aspect non négligeable de ces études est celui de l'enrichissement des connaissances non seulement en pathologie et parasitologie mais aussi en microbiologie et helminthologie générale. En effet, un nombre impressionnant de types nouveaux de vers, de protozoaires, de champignons, de virus ou de rickettsies provenant des invertébrés ont été à la base de la création de familles, d'ordres ou de classes systématiques et certains d'entre eux ont conduit encore récemment à des bouleversements en classification zoologique ou microbiologique.

Une voie de grande actualité de telles recherches est représentée par leur aspect comparé. En effet, on se rend de plus en plus compte du fait que les grands problèmes pathologiques intéressant la pathologie médicale ou vétérinaire ne peuvent être réellement compris sans leur étude du point de vue phylogénétique. De telles études doivent comprendre des recherches comparées successivement chez divers stades d'évolution des invertébrés et les mollusques constituent un groupe particulièrement vaste et diversifié de cette évolution. Les aspects auxquels la pathologie médicale s'intéresse particulièrement sont ceux de l'évolution des réactions immunologiques et des formations tumorales.

b) Parallèlement aux motivations d'ordre fondamental, celles appliquées sont devenues d'une importance capitale pour des raisons médicales et économiques.

Elles sont liées d'abord à la reconnaissance de plus en plus sûre de l'importance des mollusques en tant que vecteurs de maladies parasitaires et contagieuses dont certaines,

comme les schistomatoses, ont une extension mondiale. Les recherches à leur sujet, à peine entrées à leur phase approfondie, se portent à la fois sur le problème des relations parasites-vecteurs et la lutte anti-vecteur et sont soutenues par des organisations nationales et internationales.

Un intérêt international s'attache depuis peu aussi à l'étude de l'action pathogène des divers types de pollution physique et chimique, surtout en milieu marin. Pour ces études, les mollusques constituent d'excellents sujets, d'une part à cause de leur importance dans la faune marine, d'autre part en tant qu'animaux-tests.

Enfin, le progrès considérable accompli depuis quelques années dans la production intensive de mollusques comestibles confère une importance économique et une urgence à l'étude des causes et à la mise au point de la prophylaxie et de la thérapeutique des épizooties compromettant les élevages. Un effort particulier est apparu depuis quelques années dans le domaine de l'ostréiculture concernant les huîtres, en grande partie à cause des épizooties généralisées dont l'une a eu pour conséquence l'élimination complète de l'huître portugaise des côtes européennes et son remplacement par *Crassostrea gigas*. Des infections virales de type nouveau ont pu être liées à ces désastres. Parallèlement, d'autres grands problèmes sur les côtes américaines et européennes ont motivé des études suivies sur l'action de protistes probablement proches des Haplosporidies. Récemment, même des infections rickettsiennes ont été décelées sans toutefois avoir pour le moment des précisions sur leur rôle économique. Les études pathologiques et parasitologiques se poursuivent de plus en plus activement sur d'autres mollusques marins susceptibles d'avoir un intérêt alimentaire et d'être des candidats pour une exploitation en maréculture.

o o o

Les différentes motivations évoquées, de nature fondamentale ou appliquée, sont sans aucun doute les moteurs les plus puissants du tournant actuel dans l'évolution de la pathologie et la parasitologie des mollusques soulignée au début de cet exposé. L'actualité croissante de ces différents aspects a incité en effet des chercheurs et des Instituts de divers pays à s'intéresser de plus en plus activement à cette discipline qui, jusqu'alors, a été traitée d'une manière relativement sporadique. Très récemment, plusieurs organisations internationales, comme l'Organisation Mondiale de la Santé ou le Comité International d'Exploitation des Océans, ont estimé utile de porter ces aspects au premier plan à la suite de la sensibilisation générale qui s'est fait jour depuis plusieurs années au sujet de la protection des mers contre la pollution, le remplacement progressif de l'exploitation non contrôlée des produits de la mer par l'aquaculture et le rôle des vecteurs dans des épidémies humaines à extension mondiale.

Toutefois, pour assurer une réelle efficacité des programmes poursuivis dans différentes parties du monde, la confrontation des résultats et la discussion des orientations s'avèrent indispensables à l'heure actuelle. Plusieurs réunions concernant des aspects précis de ces problèmes ont eu lieu récemment. Toutefois, le présent Colloque envisage pour la première fois les débats sur un plan synthétique concernant les questions d'actualité. Ses caractéristiques susceptibles de permettre d'y parvenir sont d'abord le large éventail des pays

participants et la présence de parasitologistes, de pathologistes, de malacologues et de représentants des secteurs appliqués et économiques. Les autres éléments déterminants sont le programme portant parallèlement sur les mollusques marins, aquatiques et terrestres et la confrontation des grandes motivations, telles que le parasitisme, la vection d'intérêt médical, la pathologie microbienne, physiologique et oncologique et, enfin, des aspects appliqués, notamment ceux impératifs en élevages terrestres et en maréculture.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 25 à 31

LES SPOROZOAIRES PARASITES DE MOLLUSQUES

par René Ormières[*]

RESUME

Liste commenté des Sporozoaires (Grégarines et Coccidies) parasites de Mollusques.

SPOROZOA PARASITES OF MOLLUSCS

SUMMARY

A commented list of Sporozoa (Gregarines and Coccidia) parasitic in Molluscs.

On distingue parmi les Sporozoaires de Mollusques les Grégarines et les Coccidies.

GREGARINES

A. Grégarines dont le Mollusque est l'hôte unique

- *Gonospora testiculi* (Trégouboff, 1916) Trégouboff, 1918. C'est une Monocystidée parasite du testicule de *Cerithium vulgatum* Brug. (Banyuls - Villefranche sur Mer), décrite sous le nom de *Cystobia* par Trégouboff (1916). Elle envahit uniquement l'épithélium germinatif, jamais les spermatogonies et les spermatocytes. Le début du développement est intracellulaire. Ensuite la Grégarine tombe dans la cavité testiculaire où se continue le cycle. Trégouboff mentionne que "les *Gonospora* produisent une véritable castration directe mais cette castration est toujours partielle et incomplète. La fécondité de l'hôte se trouve atteinte seulement en partie". Cet auteur signale une autre *Gonospora* dans *Turritella communis* (Banyuls).

- *Gonospora duboscqui* Tuzet, 1931. Monocystidée peu différente de la précédente. Les jeunes sont situés dans les cellules conjonctives de la paroi de l'ampoule testiculaire de *Bythinia tentaculata L.* (Montpellier).

- *Gregarina pterotrachea* (Stuart, 1871) Labbé, 1899. Décrite par Stuart comme *Zygocystis*, cette grégarine a été placée par Labbé dans le genre *Gregarina*. On a peu de

(*) Station Biologique 34200 SETE (France)

renseignements sur ce parasite de la cavité générale de *Pterotrachea* ; il est douteux qu'il appartienne au genre *Gregarina*, plutôt inféodé aux Arthropodes (Odessa).

- "Gregarine-like" Sawyer et Newman, 1973. Parasites d'huitres des USA. La description succincte donnée par les auteurs est insuffisante pour préciser une position systématique. Ce parasite peut causer une inflammation intestinale (Maryland et Connecticut).

B. Grégarines dont le Mollusque est l'un des 2 hôtes du cycle.

Ce sont toutes des *Porosporidae*, dont le cycle se déroule en partie chez un Mollusque, en partie chez un Crustacé. On distingue actuellement 3 genres : *Porospora*, *Nematopsis* et *Pachyporospora*. La partie du cycle-Mollusque du dernier genre n'est pas connue, mais doit exister. Les deux premiers genres ne sont pas distinguables l'un de l'autre dans le Crustacé mais présentent des stades différents chez le Mollusque, d'après Hatt (1931). *Porospora* serait représenté chez le Mollusque par des sporozoïtes en groupement hélicoïdal, sans enveloppe ; *Nematopsis* aurait un sporocyste à coque épaisse, contenant un seul sporozoïte Le cycle de Porospora, avec stades à spores nues, n'a été obtenu qu'expérimentalement par Hatt, avec la Grégarine *Porospora gigantea*, évoluant chez *Trochocochlea mutabilis*.

Un cycle schématique de *Porosporidae* peut s'établir ainsi : le sporocyste enrobé dans les tissus du Mollusque est avalé par le Crustacé et le (ou les) sporoïte est libéré dans la lumière intestinale de ce dernier. Il se fixe à l'épithélium intestinal, croît puis se détache. Les Grégarines libres dans la lumière intestinale s'associent deux à deux ou en chaine. De tels ensembles se refixent à la cuticule rectale du Crustacé, s'enkystent et donnent dans le kyste, de nombreuses gymnospores constituées d'éléments uninucléés. Les gymnospores sont libérées dans l'eau de mer et elles sont phagocytées par les cellules d'un Mollusque, deuxième-hôte. Là, la gymnospore se désagrège et chaque élément uninucléé s'entoure d'une enveloppe pour constituer un sporocyste monozoïque, dans le cas de *Nematopsis*.

Une discussion a été soulevée à propos de ce cycle : quelle est la nature des éléments formant une gymnospore, autrement dit qu'elle est la valeur du stade infestant le Mollusque ?

Certains auteurs (Hatt par exemple) pensent que ce sont des mérozoïtes ou des gamètes. D'autres (Prytherch, 1940) leur attribuent valeur de sporozoïtes. Le sporozoïte formerait autour de lui une enveloppe chez le Mollusque qui serait ainsi seulement un hôte d'attente. Cette deuxième hypothèse est certainement la bonne.

Il serait fastidieux de donner ici la liste complète des Mollusques renfermant les sporocystes de *Porosporidae*. Pour les Lamellibranches, l'éventail va de *Mytilus*, *Ostrea*, *Cardium* à *Scrobicularia* ou *Pecten*. Pour les Gastéropodes, il va de *Trochocochlea* ou *Gibbula* à *Conus*.Il faut y ajouter l'Amphineure *Chiton caprearum*.

COCCIDIES

A. Coccidies dont le Mollusque est l'hôte unique

- *Isospora rara* Schneider, 1881. Schneider signale cette Coccidie chez une "petite limace noire" trouvée dans l'Aisne et crée pour elle le genre *Isopora*. Un problème peut être mentionné à propos de ce genre dont *Isospora rara* est l'espèce type. Selon Schneider, les sporocystes contiennent "des corpuscules falciformes assez nombreux". Depuis, plus de cent espèces ont été placées dans ce genre, surtout parasites d'Oiseaux et de Carnivores, espèces dont les sporocystes renferment seulement 4 sporozoïtes. Levine (1973) pense qu'en attendant la redescription de *I. rara*, le Statu-quo doit être conservé. Pellerdy (1963) note comme hôtes *Limax cinereoniger* et *L. griseus*.

- *Barrouxia bulini* Triffitt, Buckley et Mc Donald, 1932. Parasite d'*Isidora tropica*. Le genre *Barrouxia* étant inféodé aux Myriapodes, il parait anormal de retrouver un de ces représentant chez un Mollusque.

- *Merocystis kathae*, Dakin, 1911. Dakin crée le genre pour cette espèce, parasite de *Buccinum undatum* (Irish Sea). La Coccidie est logée dans les organes rénaux du Mollusque. Les sporocystes sont très nombreux et dizoïques d'après Patten (1935) alors que Dakin mentionne que "the spores are monozoic".

- *Pfeifferinella* Wasielewsky 1904. Le genre a été créé pour une Coccidie parasite du foie de *Planorbarius corneus* avec l'espèce *ellipsoides*. Le cycle a été repris par Léger et Hollande (1912) qui ont retrouvé l'espèce des Planorbes, et une autre espèce *P. impudica* dans le foie de *Lehmannia marginata*. Ils signalent d'autres Coccidies du même genre chez *Succinea putris* Linn. et *Physa fontalis* Linn. La caractéristique principale du genre est un "tube vaginal" émis par le macrogamète, par lequel passent les microgamètes extrêmement petits. L'ookyste se transforme en un seul sporocyste à 8 sporozoïtes.

- *Pseudoklossia* Léger et Duboscq, 1915. Genre créé pour *Pseudoklossia glomerata*, du rein de *Tapes floridus* Lam. et *T. virgineus* L. Le parasite est contenu dans une cellule qui s'hypertrophie. Nombreux sporocystes sphérique dizoïques dans l'ookyste.

D'autres espèces ont été signalées chez les Mollusques : *P. pelseneeri* (Leger, 1897) Léger et Duboscq, 1915, de *Donax sp* et *Tellina* sp. ; *P. pectinis*

Lég. et Dub., 1917, du rein des *Pecten* ; *P. chitonis* Debaisieux 1919, de l'hépatopancréas et des canaux digestifs d'*Acanthochites fascicularis* ; *P. patellae* Debaisieux, 1919, de *Patella vulgaris* et peut être de *Trochus*.

- *Klossia* Schneider, 1875. Contrairement à tous les genres précédents qui sont des *Eimeriidea*, les *Klossia* sont des *Adeleidea*. Schneider a créé le genre avec l'espèce *Klossia helicina*, parasite du rein d'*Helix hortensis* Müll. On rencontre cette espèce dans *H. hispida L.*, *H. nemoralis* L., *H. arbustorum* L., *H. fruticum* Müll. et *H. umbrosa* Partsch. Une variété peu différente a été trouvée chez *Succinea putris* L., *S. pfeifferi* Rssm. et *S. gigantea* (cf. Labbé, 1899).

En 1881, Schneider étudie succinctement une nouvelle espèce *Klossia soror*, parasite du rein de *Neritina fluviatilis*.

Moroff (1911) décrit *Klossia vitrina* chez *Vitrina eliptica* tandis que Chatton (1939) signale une *Klossia* sp., chez *Loripes lacteus*.

Mais c'est Nabih (1938) qui définit parfaitement le genre à propos de *Klossia loosi*, parasite des Limaces (*Arion*). Cet auteur reconnait quatre schizogonies successives dans les cellules du rein. Les ookystes renferment de nombreux sporocystes à quatre sporozoïtes.

- *Adelea pachelabrae* de Mello, 1921. Rencontrée dans l'intestin et les glandes digestives du Mollusque *Pachelabra moestra* Reeve de l'Inde. Wenyon (1926) note que cette Coccidie ayant 2 sporocystes dizoïques par ookyste ne peut appartenir à ce genre.

B. Coccidies dont le Mollusque est l'un des deux hôtes du cycle

Ce sont les *Aggregata*, Coccidies dont le schizogonie se déroule chez un Crustacé et la phase sexuée chez un Céphalopode.

La schizogonie s'effectue dans le tissu péri-intestinal et les éléments qui en sont issus, uninucléés, passent dans le Céphalopode lorsque ce dernier mange le Crabe. Ces mérozoïtes traversent l'épithélium intestinal et se logent dans le tissu connectif entourant l'intestin du Mollusque. Le cycle chez le Céphalopode est un cycle classique d'*Eimeriidea* et aboutit aux sporocystes qui sont avalés par un Crustacé. Dans l'intestin de ce dernier, le sporocyste s'ouvre, libère les sporozoïtes qui, traversant l'épithélium intestinal, forment les schizontes appendus à l'intestin.

On peut rencontrer la gamétogenèse et la sporogenèse d'*Aggregata* dans quelques Céphalopodes dont *Octopus* et *Sepia*. Mais il est difficile de définir les espèces, la relation entre telle schizogonie dans un Crustacé et telle sporogonie dans un Mollusque étant peu souvent établie.

Moroff (1908) donne une longue liste d'espèces rencontrées dans les Céphalopodes mais la plupart sont difficiles à accepter. Vivarès (1969) cite de nombreux Crustacés hébergeant des stades d'*Aggregata*.

Cette liste de Sporozoaires parasites de Mollusques montre le grand éventail que l'on peut rencontrer chez ces hôtes : des Grégarines monoxènes aux Grégarines à deux hôtes ; des Coccidies monoxènes incluant des *Eimeriidea* et des *Adeleidea*, aux Coccidies à deux hôtes obligatoires.

Chez les Mollusques, la localisation des parasites est variée. *Gonospora* se rencontre dans les testicules ; les "soi-disant" *Gregarina* dans la cavité générale ou l'intestin ; les sporocystes de *Nematopsis* dans tous les tissus, branchies, manteau, muscle etc. ; *Aggregata* dans la sous-muqueuse intestinale ; *Merocystis*, *Pseudoklossia*, *Klossia* dans les tissus rénaux, *Pfeifferinella* dans le foie.

En général, ces parasites sont peu ou pas pathogènes mais, dans certains cas, des études plus poussées pourraient démontrer le contraire. On peut tout de même citer le cas des *Gonospora* qui diminuent la fécondité de l'hôte.

Prytherch (1940) attribuait à *Nematopsis ostrearum (Porosporidae)* des mortalités importantes dans les lits naturels et les élevages de l'huître *Crassostrea virginica*, allant de 50 à 95 % . Il décrivait les symptomes de la maladie : paralysie totale ou partielle du muscle adducteur, arrêt de croissance de la coquille, rétraction du manteau. Après étude expérimentale, Sprague et Orr (1955) n'ont pas apporté d'arguments nets en faveur de ces faits : "the experimental data lend no support to the view that the numbers of spores which have been observed to occur naturally in oysters are significant factors in mortality".

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DAKIN W.J., 1911 - Notes on a new Coccidian (*Merocystis kathae* n. gen. and sp.) occuring in the renal organ of the whelK. *Arch. f. Protist.*, *23*, 145-153.

DEBAISIEUX P., 1919 - Quelques Protozoaires parasites des Chitons et des Patelles. *C.R. Soc. Biol.*, *82*, 1400-1402.

HATT P., 1931 - L'évolution des Porosporides chez les Mollusques. *Arch. Zool. Exp.*, *72*, 341-415.

LABBE A., 1899 - Sporozoa. *Das Tierreich*, *5*, 1-180.

LEGER L., 1897 - Sur la présence de Coccidies chez les Mollusques Lamellibranches. *C.R. Soc. Biol.*, *4*, 987-988.

LEGER L. et DUBOSCQ O., 1915 - *Pseudoklossia glomerata* n. gen. n. sp., Coccidies de Lamellibranches. *Arch. Zool. Exp.*, *55*, 7-16.

LEGER L. et DUBOSCQ O., 1917 - *Pseudoklossia pectinis* n. sp. et l'origine des Adeleinées. *Arch. Zool. Exp.*, *56*, 88-94.

LEGER L. et HOLLANDE G.C., 1912 - La reproduction sexuée chez les Coccidies du genre *Pfeifferinella*. *Arch. Zool. Exp.* *5*, sér. 9, 1-8.

LEVINE N.D.,1973 - Introduction, History and Taxonomy (in The Coccidia) Hammond et Long Ed. 1-22.

MELLO F. de, 1921 - Protozoaires parasites du *Pachelabra moestra* Reeve. *C.R. Soc. Biol.*, *84*, 241-242.

MOROFF T., 1908 - Die bei Cephalopoden vorkommenden Aggregataarten als Grundlage einer Kritischen Studie über die Physiologie des Zellkernes. *Arch. f. Protist.*, *11*, 1-224.

MOROFF T., 1911 - Untersuchungen über Coccidien II. *Klossia vitrina Mor. Arch. f. Protist.*, *23*, 51-70.

NABIH A., 1938 - Studien über die Gattung *Klossia* and Beschreibung des Lebenzyklus von *Klossia loosi* (nov. sp.) *Arch. f. Protist.*, *91*, 474-515.

PATTEN R., 1935 - The life-history of *Merocystis kathae* in the Whelk, *Buccinum undatum*. *Parasitology*, *27*, 399-430.

PELLERDY L.P., 1963 - Catalogue of *Eimeriidea (Protozoa-Sporozoa)*. *Verl. Ungar. Ak. Wissensch.* 1-160.

PRYTHERCH H.F. 1940 - The life-cycle and morphology of *Nematopsis ostrearum* sp. nov., a Gregarine parasite of the Mud-Crab and Oyster. *J. Morph.*, *66*, 39-65.

SAWYER T.K.and NEWMAN M.W., 1973 - Seasonal pathology in the American Oyster associated with a Gregarine-like Intestinal Parasite. *J. Protozool.*, *20*, 511.

SCHNEIDER A., 1875 - Note sur la psorospermie oviforme du Poulpe. *Arch. Zool. Exp.*, *4*, 40-45.

SCHNEIDER A., 1881 - Sur les Psorospermies oviformes ou Coccidies. Espèces nouvelles ou peu connues. *Arch. Zool. Exp.*, *9*, 387-404.

SPRAGUE V.and ORR P.E., 1955 - *Nematopsis ostrearum* and *N. prytherchi (Eugregarina-Porosporidae)* with special reference to the host parasite relations. *J. Parasitol.*, *41*, 89-104.

STUART A., 1871 - Uber den Bau der Gregarininen. *Bull. Ac. St. Petersb.*, *15*, 496-502.

TREGOUBOFF G., 1916 - *Cystobia testiculi* n. sp., Grégarine parasite du testicule d'un Mollusque Gastéropode Prosobranche, *Cerithium tuberculatum* L. *C.R. Soc. Biol.*, *79*, 652.

TREGOUBOFF G., 1918 - Etude monographique de *Gonospora testiculi* Trég., Grégarine parasite du testicule de *Cerithium vulgatum* Burg. *Arch. Zool. Exp.*, *57*, 471-509.

TRIFFITT M. BUCKLEY J.J.C.and Mc DONALD W.A., 1932 - On a new parasitic protozoan associated with a sickness in a bilharzian intermediate host. *J.Helm.*, *10*, 45-52.

TUZET O., 1931 - Une grégarine parasite de *Bythinia tentaculata* L., *Gonospora duboscqui* n. sp., appareil de Golgi, Mitochondries,vacuome. *Arch. Zool. Exp.*, *71*, 16-20.

VIVARES C.P.,1969 - Etude du parasitisme des Crustacés décapodes Brachyoures en Méditerranée Occidentale. Thèse 3ème cycle (6-11-69). Montpellier 1-177.

WASIELEWSKY T., 1904 - Studien und Mikrophotogramme zur Kenntnis der Pathogenen Protozoen Leipzig.

WENYON C.M., 1926 - Protozoology (2 volumes) Baillière, Tindall et Cox eds.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 33 à 37

PROTISTAN PARASITES OBSERVED IN THE EUROPEAN FLAT OYSTER (*OSTREA EDULIS*) AND THE COCKLE (*CERASTODERMA EDULE*) FROM SOME COASTAL AREAS OF THE NETHERLANDS

by Paul van Banning[(*)]

SUMMARY

Since 1974 special attention has been paid to parasitological and pathological research of shellfish in The Netherlands as result of the violent extension of the haplosporidian oyster parasite *Marteilia refringens*, occurring in Brittany, France, and its possible threat for the Dutch oyster culture. During this study several protistans have been noted, some of which are known to be true parasites or pathogens but also other which are less certain in their parasitic character. In the European flat oyster following protistan genera were observed : *Cristispira, Hexamita, Ancistrocoma, Trichodina, Marteilia* and *Minchinia*. In cockles the protistan genera *Trichodina* and *Nematopsis* were found.

PROTISTES PARASITES OBSERVES CHEZ L'HUITRE PLATE (*OSTREA EDULIS*) ET LE COQUE (*CERASTODERMA EDULA*) DES COTES DES PAYS-BAS

RESUME

Depuis 1974 une attention particulière a été accordée en Hollande à la recherche sur la pathologie et la parasitologie des huitres à la suite de l'extension violente de l'haplosporidie *Marteilia refringens* parasite noté en Grande Bretagne et en France et à cause de son impact possible sur l'ostréiculture hollandaise. Au cours de cette étude plusieurs protistes ont été notés dont certains sont connus en tant que parasites ou pathogènes et aussi d'autres dont la nature parasitaire parait moins certaine. Chez l'huitre plâte les genres de protistes suivants ont été observés : *Cristispira, Hexamita, Ancistrocoma, Trichodina, Marteilia* et *Minchinia*. Chez les coques, les genres *Trichodina* et *Nematopsis* ont été trouvés.

INTRODUCTION

In recent decades more and more comprehensive studies on parasitological and pathological subjects of shellfish have been made, due mainly to catastrophic mortalities resulting from disease in different shellfish production areas over the world and to the increasing economic importance of shellfish farming. In these studies records have been

(*) The Netherlands Institute for Fishery Investigations, Haringkade 1, Ymuiden-1620, The Netherlands.

made of many parasites occurring in shellfish species of commercially importance (Cheng, 1967 ; Sprague, 1970 ; Sindermann, 1976). Although it must be realised that parasitism is a widely distributed and natural phenomenon and need not always automatically be associated with diseased condition or mortalities, it can be stated that the most serious group of parasites responsable for disease conditions in shellfish are protistans. Examples of serious protistan activities can be found in the middle-east coast of North-America, where the haplosporidian parasites *Minchinia costalis* and *Minchinia nelsoni* threaten the production of the American Oyster, *Crassostrea virginica*. In Europe recently a serious outbreak of another haplosporidian parasite, *Marteilia refringens*, threatens the production of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in Brittany, France. The spread of the latter organism made the Dutch Fishery Investigations alert for the possibility of extension of *Marteilia refringens* to the Dutch oyster area because of the regular importation of oysters from Brittany. Therefore a research program started in March 1974 paying special attention to the occurrence of *Marteilia refringens*. The program also offered the possibility of observing other parasites and the protistans discovered are mentioned in this paper.

Later another study was started as result of abnormal mortalities of cockles in the period April - June 1977 in some areas of the north coast of the Netherlands.

MATERIAL AND METHODS

Samples of oysters are taken of lots at importation and also from the beds at different times after planting. The cockles are sampled in areas with abnormal mortalities as well as some areas with normal situation.

The material is studied with squash preparation of fresh material using interference optics in the light microscope. Where necessary histological studies were carried out with material fixed in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) and stained generally with Mayer's hematoxylin with phloxine as counterstain. For electron microscope studies material was fixed in 4 % glutaraldehyde, made up in 3 % NaCl at pH 7.2.

RESULTS

A) European flat oyster, Ostrea edulis

Cristispira balbianii (subphylum Sarcomastigophora ; superclass Mastigophora). Spirillum-like organism, 40-100 micron long, about 1 micron thick, corckscrew rotating on its long axis.
Frequency : various, some oysters show an overwhelming mass.
Site : digestive diverticula, stomach, intestine and shell liquor.
Remarks : found to be present in oysters of The Netherlands as well in oysters originating from Greece, Italy, Yugoslavia, France, Ireland and England.

Hexamita inflata (subphylum Sarcomastigophora ; class Zoomastigophora)

Free-living flagellate, broadly oval, 13-25 x 9-15 micron, eight flagella present of which six anterolateral and two trailing. Frequency : low, sometimes oysters can have an overwhelming mass. Site : digestive diverticula, stomach and shell liquor.
Remarks : observed in oysters of The Netherlands, France and Ireland.

Ancistrocoma pelseneeri (subphylum Ciliophora : class Ciliatea) Elongate pyriform holotrichous ciliate, about 50-80 micron long. Frequency : various, some oysters can have an overwhelming mass. Site : digestive diverticula, gills and shell liquor.
Remarks : observed in oysters of The Netherlands, France and Ireland.

Trichodina sp. (subphylum Ciliophora ; class Ciliatea). Discoidal peritrichous ciliate, diameter 75-80 micron, 33-35 denticles. Frequency : low, Site : gills and stomach.
Remarks : most frequent in oysters held for some time in oyster pits.

Marteilia refringens (subphylum Sporozoa ; class Haplosporea). Haplosporidian protistan, several stages, measuring 5-30 micron. Mature "sporangia" with spores and typical refringent bodies. Frequency : various, linked with imports originating from Brittany, France.
Site epithelium and lumen of digestive diverticula and stomach. Remarks : special survey of the situation in the Dutch oyster farming during 1974-1977 revealed that this protistan is introduced by importations from Brittany. It can survive in Dutch circumstances, but no extension could be observed nor were there serious mortalities. This is contrary to the situation in France and north-west Spain.

Minchinia armoricana (subphylum Sporozoa ; class Haplosporea). Haplosporidian protistan, several stages. Spores measuring 4.0-5.5 x 3.0-4.5 micron with feature to eject 2 thread-like projections of 70-100 micron long in squash preparation. Frequency : rare, in the period 1974-1977 only 4 cases observed in about 5400 oysters examined histologically.
Site : connective tissue. Remarks : this is a newly described oyster parasite, first observed in 1974 and originating from Brittany, France (van Banning, 1977).

B) Cockle, Cerastoderma edule

Trichodina sp. (subphylum Ciliophora ; class Ciliatea) Discoidal peritrichous ciliate, diameter 60-70 micron, 24 denticles. Frequency : common, in some cockles very abundant. Site : surface of gills and mantle. Remarks : observed in cockle areas of north and south coast of the Netherlands, but most frequent in some mortality areas.

Nematopsis sp. (subphylum Sporozoa ; class Telosporea). Ellipsoidal spores, about 10 x 8 micron, with vermiform sporozoite. Frequency : rather common. Site : mainly gills.
Remarks : observed in cockle areas of north and south coast of the Netherlands.
The spores belong probably to N. schneideri.

DISCUSSION

It is of importance to know the "pathological value" of protistans to interpret more accurately abnormal shellfish mortalities due to their presence and to exclude physical conditions. For some protistans it is clear that they are pathogenic for their shellfish host. It can be seen histologically by increased internal defense mechanism of shellfish (for instance abnormal infiltration of haemocytes in connective tissue) and also very often macroscopically by gaping of the valves and thin, shrunken or glassy appearance of the meat with a pale coloured hepatopancreas. These characteristics can be clearly observed in *Ostrea edulis* infected by the haplosporidians *Marteilia refringens* and *Minchinia armoricana*, which can be considered therefore as true pathological parasites for the oysters. The other protistans mentioned cannot be always classified so easily as truely parasitic or pathogenic. In the case of the common and wide spread occurrence of *Cristispira* it is uncertain whether commensalism or parasitism is involved. For long time the general opinion has been that *Cristispira* must be considered as commensal or "normal inhabitant" of the oyster (Gross, 1910 ; DIMITROFF, 1925). However, the author has still some doubts about the total innocence of *Cristispira* because of the occurrence of some oysters showing an abnormal bloom of this organism. Comparable cases can be observed with *Ancistrocoma*, *Hexamita* and *Trichodina* : they are commonly present at low incidence in healthy shellfish but sometimes blooms occur linked with diseased conditions in shellfish. It is questionable whether these protistans are primary pathogens or - what seems more likely - secondary, as a result of disturbed defense mechanism and condition of the host due to other causes, offering the protistans better chances for rapid multiplication and extension at the cost of the host, which can be considered as a parasitism with pathological characteristics. Perhaps they can be classified best as opportunistic parasites. *Hexamita* is known to be parasitic and pathogenic for oysters under special conditions. Such outbreaks of Hexamitiasis are observed as "pit disease" in oysters who are kept for long period in pits and show descreasing condition (Korringa, 1951 ; Mackin et al., 1952). *Ancistrocoma* has been observed several times en masse in oysters kept under unfavourable conditions in aquaria as well as in overcrowded stocked oysters from oyster growers. It is not yet possible to estimate the importance of *Trichodina* as a pathological agent, but it was noted that most serious overcrowdings of this ciliate were observed in cockle areas showing mortalities. In the case of *Nematopsis* no clear indications of its pathological significance were found. Superficial observations of cockles from areas with mortality as well normal areas showed the occurrence of *Nematopsis* in about the same order in both. In the literature *Nematopsis* is characterised sometimes as pathological but in most cases in considered as probably of hardly any influence (Cheng, 1967 ; Sprague, 1970). More investigations are needed into the real parasitological and pathological significance of the occurrence of protistans in shellfish, especially under extreme conditions.

REFERENCES

CHENG, T.C., 1967 - Marine molluscs as hosts for symbioses. With a review of known parasites of commercially important species. *Adv. mar. Biol.*, *5*, 424.

DIMITROFF V.T., 1926 - Spirochaetes in Baltimore market oysters. *J. Bacteriol.*, *12*, (2), 135-177;

GROSS J., 1910 - Cristispira nov. gen., ein Beitrag zur Spirochaetenfrage. *Mitt. Zool. Station Neapel*, *20*, (1), 41-94.

KORRINGA P., 1961 - Putzieke oesters. *Visserij-Nieuws*, *4* (7), 1-4.

MACKIN J.C., KORRINGA P. HOPKINS S.H., 1952 - Hexamitiasis of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Bull. mar. Sci. Gulf Caribb.*, *1*, 266-277.

SHAW B.L. BATTLE H.I., 1957 - The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canad. J. Zool.*, *35*, 325-347.

SINDERMANN C.J., 1976.- Oyster mortalities and their control. In : FAO Technical Conference on Aquaculture, Kyoto, Japan. FIR : AQ/Conf/76/R34, 25 pp.

SPRAGJE V., 1970 - Some protozoan parasites and hyper-parasites in marine bivalve molluscs. In : S.F. Snieszko (ed.), A symposium on diseases of fishes and shellfishes. *Spec. publ. 5, Am. Fish. Soc. Washington*, D.C., 511-526.

VAN BANNING P., 1977 - Minchinia armoricana sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the Eurpoean flat oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Invertebr. Pathol.*, *30*, 199-206.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 39 à 48

LES MICROSPORIDIES PARASITES DE MOLLUSQUES

par Jean Maurand et Claude Loubès (*)

RESUME

Six espèces de Microsporidies parasites de Mollusques Lamellibranches et Gastéropodes sont actuellement déterminées avec précision. Le genre *Steinhausia* leur est propre et se caractérise par un kyste à paroi fine et des spores peu différenciées (filament polaire court mais entouré d'une gaine alvéolaire, endospore réduite, polaroplaste absent). Les relations avec l'hôte (spécificité, transmission, pathologie) sont discutées. Il est souligné que deux espèces de Microsporidies peuvent infecter à la fois le Mollusque et le Trématode hébergé.

MICROSPORIDIA PARASITIC IN MOLLUSCS

SUMMARY

At present, six species of Microsporidia parasitic in Pelecypods and Gastropods are accurately determined. So far, the genus *Steinhausia* has only been described among them and is characterized by thin-walled cysts and poorty differenciated spores (short polar filament wrapped in a honeycomblike layer, reduced endospore, polaroplast absent). The host-parasite relationships (specificity, transmission, pathology) are discussed. It is noteworthy that two species may infect both the Molluscan host and the Trematode.

INTRODUCTION

Les Microsporidies de Mollusques constituent, à l'heure actuelle, un groupe restreint comprenant six espèces au moins partiellement déterminées et trois espèces totalement indéterminées, parasites de Lamellibranches et Gastéropodes Pulmonés. Néanmoins, leur intérêt théorique et pratique est certain :

1) Intérêt théorique :

- le genre *Steinhausia* Sprague, Ormières et Manier, 1972, qui sera caractérisé dans le chapitre consacré aux travaux réalisés en microscopie électronique, est propre aux Mollusques ;
- les tissus du Mollusque constituent la voie d'accès de la Microsporidie aux larves de Trématodes hébergées (hyperparasitisme) et les deux hôtes peuvent être parasités par la même Microsporidie.

(*) Laboratoire d'Ichthyologie et de Parasitologie Générale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place E. Bataillon, 34060 Montpellier (France)

2) Intérêt pratique : il découle de ce qui précède que les Microsporidies peuvent être envisagées pour le contrôle des vecteurs du Schistosome, si ce n'est pour le contrôle du Schistosome lui-même.

Cette étude monographique des Microsporidies de Mollusques envisagera successivement:

- l'historique et la caractérisation des espèces,
- les études faites en microscopie électronique,
- les relations hôte-parasite (hôtes de spécificité, transmission, action du parasite sur l'hôte).

HISTORIQUE ET CARACTERISATION DES ESPECES

Steinhausia ovicola (Léger et Hollande, 1917)
Chytridiopsis ovicola Léger et Hollande, 1917
Steinhausia ovicola Sprague, Ormières et Manier, 1972

Léger et Hollande (1917) décrivent un parasite de quelques ovules de *Ostrea edulis* en provenance de Marennes. Ce parasite, rappelant les *Chytridiopsis* de l'épithélium intestinal des Insectes et Myriapodes mis en évidence par Léger et Duboscq (1909), est nommé *Chytridiopsis ovicola* malgré l'absence de paroi kystique aux stades sporulés.

Sprague, Ormières et Manier (1972), à la suite des travaux de Manier et Ormières (1968) et Richards et Sheffield (1970), créent le nouveau genre *Steinhausia* pour les *"Chytridiopsis"* de Mollusques qui se distinguent des *Chytridiopsis* (espèce type : *Chytridiopsis socius* Schneider, 1884) de Coléoptères et Myriapodes par l'absence de kystes durables à paroi résistante. *Chytridiopsis ovicola* devient donc *Steinhausia ovicola*.

Description succincte : stades végétatifs de 8 µm toujours observés multinucléés. Noyaux nombreux souvent groupés par deux (diplocaryon ?). Le stade sporulé est le plus fréquent : kyste sans enveloppe épaisse (diamètre = 18-10 µm) renfermant 40-60 spores. Les spores, sphériques, mesurent 2,30 µm de diamètre et sont pourvues d'un noyau périphérique.

Steinhausia mytilovum (Field, 1924)
Haplosporidium mytilovum Field, 1924
Chytridiopsis mytilovum Sprague, 1965
Steinhausia mytilovum Sprague, Ormières et Manier, 1972

Field (1924) découvre ce parasite dans les oeufs de *Mytilus edulis* au cours d'une étude monographique sur la moule. N'étant pas protistologue lui-même, il en confie la détermination à un spécialiste qui le rapproche des *Haplosporidium* : *H. mytilovum*.

Sprague (1965) compare *H. mytilovum* et *Chytridiopsis socius* (Schneider, 1884) et conclut à leur ressemblance. *H. mytilovum* devient *Chytridiopsis mytilovum*. Par contre, les morphologies de *Chytridiopsis ovicola* (Léger et Hollande, 1917) et *C. mytilovum* révèlent de

légères différences et la nécessité de maintenir distinctes les deux espèces. Dans le même travail, il montre enfin que *Chytridiopsis* qui a été rapproché des Chytridiales, Microsporidies, Mycétozoaires et des Haplosporidies est bien une Microsporidie :

- la spore a une vacuole antérieure ressemblant à celle des spores de certaines Microsporidies lorsque le filament polaire n'est pas dévaginé ;
- la spore de *Chytridiopsis* ressemble à celle de *Cocconema* ;
- enfin et surtout, la spore de *Chytridiopsis* présente un granule antérieur APS-positif, caractéristique de la spore des Microsporidies.

Sprague, Ormières et Manier (1972) transfèrent *Chytridiopsis mytilovum* dans le genre *Steinhausia* de la même manière que *Chytridiopsis ovicola*.

Description succincte : le kyste immature renferme un nombre variable de noyaux sous forme diplocaryon. Le kyste mûr a un aspect moruliforme et comprend 32-54 spores régulièrement sphériques de 4 µm de diamètre en moyenne. La spore a une grande vacuole et un granule antérieur APS-positif.

Steinhausia brachynema (Richards et Sheffield, 1970)
Coccospora brachynema Richards et Sheffield, 1970
Steinhausia brachynema Sprague, Ormières et Manier, 1972

Richards et Sheffield (1970) décrivent *Coccospora brachynema*, Microsporidie parasite des cellules de l'épithélium intestinal du Pulmoné *Biomphalaria glabrata*. Leur étude ultrastructurale montre en particulier que le filament polaire est pourvu d'une gaine épaisse à structure alvéolaire.

Sprague, Ormières et Manier (1972), soulignent la ressemblance des filaments polaires de *Coccospora brachynema* et *Chytridiopsis socius* (travail de Manier et Ormières, 1968) entourés de la même gaine à structure alvéolaire. En outre, les spores des deux genres ont une endospore rudimentaire ou absente, sont dépourvues de polaroplaste ; le filament polaire est court. En conséquence, ces auteurs :

1) rapprochent les deux genres à l'intérieur de la nouvelle famille des *Chytridiopsidae* ;

2) discutent la validité du genre *Coccospora* (Kudo, 1925) qui est sujette à caution (Weiser, 1961, l'a lui-même inclus dans le genre *Nosema* Nägeli, 1857) ;

3) créent le genre *Steinhausia* pour les trois Microsporidies de Mollusques *(Chytridiopsis ovicola, C. mytilovum, Coccospora brachynema)*.

Steinhausia Sprague, Ormières et Manier, 1972 et *Chytridiopsis* Schneider, 1884 sont distincts : *Chytridiopsis* présente deux types de parois kystiques (mince et épaisse) et se trouve chez les Myriapodes et les Coléoptères ; le kyste sporogonique de *Steinhausia* est seulement du type menbranaire. Ce dernier genre est caractéristique des Mollusques.

Description succincte : le kyste dans le cytoplasme de la cellule-hôte renferme 8-64 spores sphériques (diamètre moyen : 2,6 µm) ; le filament polaire est court (25 µm) et forme moins de trois tours de spire. Le noyau est central et unique.

Pleistophora husseyi Michelson, 1963

Michelson (1963) réussit à transmettre à divers Mollusques de la famille des *Physidae* une Microsporidie présente dans une suspension aqueuse de glande albumine parasitée d'une *Physa* sp. récoltée dans la nature.

Description succincte : le premier stade observé est un schizonte binucléé qui se transforme en schizonte plasmodial plurinucléé (généralement 8 noyaux, parfois 32). Le sporonte renferme 16,60 ou plus noyaux. Les spores, uninucléées, mesurent en frottis frais 4,8 - 5,4 x 3,2 µm et possèdent une large vacuole à leur extrémité élargie. La longueur du filament polaire est comprise entre 32 et 65 µ.

Pleistiphora sp. Brooks, 1967

Description succincte : Microsporidie parasite des cellules intestinales de *Deroceras reticulatum* (Müller) (Limace grise des champs en Caroline du Nord et Oregon, U.S.A.). Les pansporoblastes renferment au moins 100 spores. Présence de macrospores (6,7 x 2,0 µm) et de microspores (4,5 x 2,0 µm). La schizogonie n'a pas été observée.

Nosema eurytremae (Canning et Basch, 1968)
Perezia helminthorum Canning et Basch, 1968
Nosema eurytremae Canning, 1972

Canning et Basch (1968) découvrent *Perezia helminthorum* dans les stades larvaires des Trématodes *Eurytrema pancreaticum* et *Postharmostomum gallinum* en Malaisie.

Basch (1971) montre que cette Microsporidie peut se développer dans les tissus et organes (appareil reproducteur, glande digestive, tissus divers) du Planorbe en l'absence du trématode et justifie ainsi la présence de ce parasite dans ce travail.

Canning (1972), s'appuyant sur la nouvelle définition du genre *Nosema* Nägeli, 1857 (Genre disporé, sans pansporoblaste, pourvu de diplocaryons tout au long de son cycle), transfère *Perezia helmintnorum* dans le genre *Nosema*. Le nom étant déjà occupé par une Microsporidie de Cestodes, elle crée la nouvelle combinaison *Nosema eurytremae.*

Colley, Lie, Zaman et Canning (1975) font une étude en microscopie électronique de *Nosema eurytremae*.

Description succincte : tous les stades du cycle ont les noyaux sous forme diplocaryon. Les sporontes mesurent 7,8 x 1,8 µm, les sporoblastes 4,0 x 1,5 µm. Les spores, en frottis frais, sont des ovoïdes allongés de 3,5 x 2,0 µm. Le filament polaire expulsé atteint jusqu'à 75 µm ; le sporoplasme est binucléé.

Microsporidies indéterminées

Elles sont au nombre de trois :

1) Comps, Grizel, Tige et Duthoit (1975) signalent chez *Cardium edule* une infection mixte de la glande digestive comprenant un organisme proche de *Marteilia refringens* décrit chez les Huîtres (Grizel et al., 1974) et une Microsporidie.

2) Bayne, Owczarzak et Noonan (1975) mettent en évidence une Microsporidie dans leurs cultures cellulaires de *Biomphalaria glabrata*. La taille des spores ovoïdes est 1,87 x 1,17 µm. Le même pansporoblaste renferme à la fois des spores mûres et des spores en voie de développement. Les auteurs suggèrent un rapprochement avec le genre *Pleistiphora*.

3) Michelson (1976) découvre une Microsporidie attaquant à la fois l'hôte *(Biomphalaria havanensis)* et son parasite, des sporocystes de *Schistosoma mansoni*. Ce cas est à rapprocher de celui de *Nosema eurytremae*. Les spores sont ovales (1,5 - 2,0 x 0,5 µm) avec un granule antérieur APS-positif. L'infection a été acquise dans les conditions naturelles.

ETUDES ULTRASTRUCTURALES

1) Richards et Sheffield (1970) donnent de nombreuses électronographies illustrant la fin de la sporoblastogenèse et la totalité de la sporogenèse de *Steinhausia brachynema*. La sporoblastogenèse a lieu sous la forme d'un fractionnement de plasmode en éléments uninucléés, les sporoblastes, qui renferment un caryosome dans leur noyau. Le filament polaire se différencie en étroite association avec le noyau et un réseau golgien. Il est entouré d'une gaine à structure alvéolaire et a une striation transversale interne ; il ne dépasse jamais trois tours de spirale. Des clichés suggèrent que la gaine externe dégénérerait avant ou pendant la dévagination du filament, ses résidus se trouvant à l'intérieur de la spore. Les sporoblastes pré sentent parfois des éléments rappelant la structure mitochondriale ; il ne se forme pas de po laroblaste.

Les caractéristiques de *Steinhausia* correspondent bien à la diagnose de l'ordre des *Minisporida* Sprague, 1972 où il est classé : tendance générale vers un développement minimum des organites de la spore et, en contre-partie, développement maximum d'un sporocyste. Filament polaire court ; pas de polaroplaste ; spore ronde ou légèrement ovoïde ; mérogonie présente ou absente ; plasmode sporogonial produisant beaucoup de spores dans des sporocystes à parois épaisses ou fines ou dans des sporocystes des deux types (parois épaisses et parois fines). Deux familles, les *Chytridiopsidae* et les *Heisseidae*, la première comprenant les deux genres, que nous avons distingués antérieurement, *Chytridiopsis* et *Steinhausia*.

2) Lie et Colley (1971), Colley, Lie et Zaman (1971, Colley, Lie, Zaman et Canning (1975) ont étudié l'ultrastructure de *Nosema eurytremae*, parasites de *Echinostema malayanum* portés par *Indoplanorbis exustus*. Ces études sont résumées par Canning (1975) à qui est empruntée la description qui suit. Tous les stades du cycle ont des diplocaryons. Les sporontes se distinguent des schizontes par un cytoplasme plus dense et une assise superficielle plus

épaisse. Le sporonte binucléé devient tétranucléé et produit deux sporoblastes binucléés. Les sporoblastes se transforment en spores par épaississement de la paroi et formation du complexe filament polaire - polaroplaste à partir de vésicules golgiennes. Le filament décrit une spirale à douze tours dont l'angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal de la spore est précisé. Il apparaît au cours du cycle des stades uninucléés qui proviendraient soit de la division cytoplasmique d'un schizonte binucléé, soit d'une fusion nucléaire dans ce schizonte qui initierait la formation du sporonte et assurerait donc le passage de la schizogonie à la sporogonie. Cependant, Canning (1975) souligne que les preuves de l'existence d'un cyncaryon manquent.

3) Comps et al. (1975) donnent une photographie en microscopie électronique de spores de Microsporidie. Ils précisent que cette espèce semble pansporoblastique et que "les spores sont groupées dans un plasmode sporogonial comportant des formations paracristallines où alternent des zones claires et des zones denses aux électrons suivant une période de 200 Å". Les spores sont ovoïdes (2,5 x 1,3 µm) et comportent exospore et endospore, un noyau, un filament polaire enroulé sur quatre tours de spires.

4) Bayne et al. (1975) décrivent divers aspects ultrastructuraux d'une Microsporidie parasite de *Biomphalaria glabrata*. Le pansporoblaste a deux caractéristiques :

a) un non-synchronisme de la maturation des spores que les auteurs attribuent hypothétiquement aux conditions *in vitro* (étude de cultures de cellules parasitées) ;

b) une assise granuleuse entre les membranes interne et externe du pansporoblaste.

Les divisions des noyaux s'effectuent sans disparition de l'enveloppe nucléaire. Les membranes des sporoblastes semblent se former *de novo* autour des produits de division à la manière d'une sporogonie endogène. La structure sporale est banale : exospore et endospore, polaroplaste à structure lamellaire, filament polaire spiralé, vacuole postérieure.

En conclusion, les études ultrastructurales détaillées (celles qui permettent une détermination) de Microsporidies propres aux Mollusques ne concernent que la seule espèce *Steinhausia brachynema*.

RELATIONS HOTES-PARASITES

1. Les hôtes et la spécificité parasitaire

Le tableau ci-après donne la liste des Microsporidies et des hôtes chez lesquels elles ont été signalées.

Espèces de Microsporidies	Espèces-hôtes
Steinhausia ovicola	*Ostrea edulis*
Steinhausia mytilovum	*Mytilus edulis*
Steinhausia brachynema	*Biomphalaria glabrata*
Pleistophora husseyi	Pulmonés *Physidae*
Pleistophora sp.	*Deroceras reticulum*
Nosema eurytremae	Diverses larves de Trématodes *Indoplanorbis exustus* Larves d'*Aedes* et *Anopheles*
Microsporidie sp. Comps et al.	*Cardium edule*
Microsporidie sp. Michelson	*Biomphalaria havanensis* *Schistosoma mansoni*
Microsporidie sp. Bayne et al.	*Biomphalaria glabrata*

Le pourcentage de Mollusques parasités est généralement faible mais peut atteindre 36 à 82 % pour les Limaces *Deroceras reticulatum* récoltées en Caroline du Nord et Orégon. En ce qui concerne la spécificité parasitaire, les Microsporidies de Mollusques peuvent être classées en trois groupes :

a) Les espèces *Steinhausia ovicola*, *S. mytilovum* et *Pleistophora* sp. semblent inféodées à un hôte unique.

b) *Pleistophora husseyi* se développe très bien chez divers représentants de la famille des *Physidae* : *Physa heterostropha*, *Physa cubensis*, *Aplexa hypnorum*. Les essais de transmission à des Planorbes ou Limnées sont des échecs. *Biomphalaria helophila*, *B. pfeifferi* conviennent aussi à *Steinhausia brachynema* découverte chez *B. glabrata*.

c) *Nosema eurytremae* et la Microsporidie de Michelson (1976) parasitent à la fois le Mollusque et les larves de Trématodes qu'il peut héberger. Les hôtes naturels de *Nosema eurytremae* sont des larves de sept espèces de Trématodes déterminées (plus les indéterminées) (pour les détails, se reporter à Canning, 1975) et le Planorbe *Indoplanorbis exustus*. En outre, *N. eurytremae* a pu être transmise expérimentalement à des larves d'autres espèces de Trématodes et surtout à des larves d'*Aedes* et *Anopheles* (Colley, Lie et Cheong, 1971).

2. *La transmission du parasite*

La transmission du parasite semble procéder de deux manières : transmission par la voie ovarienne, transmission par ingestion.

a) Transmission héréditaire : l'infection des ovules de Lamellibranches par *Steinhausia ovicola* et *S. mytilovum* est très faible (en général un seul kyste par ovule). Ils restent fertiles et peuvent donc transmettre l'infection à la descendance.

b) Transmission par ingestion : elle correspond en général à des infections moins localisées. Ce mode d'infection est évident dans le cas des *Physidae* avec *Pleistophora husseyi*

où il est démontré expérimentalement et dans le cas de *Biomphalaria glabrata* avec *Steinhausia brachynema*. Le mode d'infection du Trématode à partir du Mollusque est lui-même mal connu (Canning, 1975).

3. Pathologie

L'ovule parasité par un kyste de *Steinhausia mytilovum* et *S. ovicola* ne paraît pas souffrir autrement que de compression et de déformation du noyau par le parasite. Cependant, Léger et Hesse (1917) signalent, dans des cas très rares d'infection par kystes multiples, une destruction de l'ovule. Quelques rares ovules étant détruits chez quelques individus femelles, l'incidence du parasitisme sur l'évolution des populations ne peut être que négligeable.

Pleistophora sp. s'attaque à l'intestin de la Limace et le rend blanc, opaque. L'infection de *Biomphalaria glabrata* par *Steinhausia brachynema* débute aussi par l'intestin mais déborde ensuite dans les tissus de l'hémicoele le jouxtant. *Pleistophora husseyi* se loge dans tous les tissus et organes sauf les cartilages radiculaires ; l'appareil reproducteur surtout, est atteint. Le tissu sain est remplacé par le parasite en voie de maturation comme c'est la règle chez les Microsporidies. *Nosema eurytremae* envahit aussi de préférence l'appareil génital; la spermathèque est plus atteinte que la glande albumine. En ce qui concerne les larves de Trématodes : les sporocystes se transforment en sacs de spores (de Microsporidies), les cercaires semblent généralement "abritées" dans des rédies légèrement parasitées, toutes les méta cercaires parasitées meurent (Canning, 1975).

Des anomalies de la coquille peuvent se développer quand le manteau est atteint. Une "doublure" tapisse l'intérieur de la coquille de quelques *Biomphalaria glabrata* infectés et les bords du péristome de *Aplexa hypnorum* peuvent s'hypertrophier jusqu'à en provoquer l'oc clusion. Il s'agit là probablement de réactions contre le parasite.

Au cours de leurs recherches sur les cultures cellulaires de *Biomphalaria glabrata*, Bayne et al. (1975) mettent en évidence une Microsporidie dont ils étudient les effets à la fois sur les cellules en culture et sur les colonies de *Biomphalaria glabrata*. Le résultat est "décevant" : les colonies infectées se développent aussi bien que les colonies saines. "Thus without selective genetic experiments, it is not conveivable that snail control may be achieved with this agent". Cependant, si les Mollusques manifestent une résistance surprenante aux parasites (Microsporidies - Larves de Trématodes), il n'en va pas de même pour ces dernières à l'égard des Microsporidies : leur taux de fécondité baisse considérablement. Il y a donc là un nouvel axe de recherche qui mérite d'être fouillé en vue d'un contrôle des *Schistosoma*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BASCH P., 1971. - Transmission of microsporidian infection in the snail *Indoplanorbis exustus* in West Malaysia. *S. E. Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, 2 : 380-383.

BAYNE C.J. OWCZARZAK A. and NOONAN W.E., 1975. - *In vitro* cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata (Pulmonata ; Basommatophora). Ann. New York Acad. Sci., 266* : 513-527.

BROOKS N.M., 1967. Preliminary observations on a microsporidian infecting the slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *The Journal of the Elisha Mitchell Scientific Sotiety, 83* (3).

CANNING E.U., 1972. - *Nosema eurytremae*, a replacement name for the secondary homonym *Perezia helminthorum* Canning and Basch, a parasite of digenean larvae. *J. Invertebr. Pathol., 20* : 371.

CANNING E.U., 1975. - The microsporidian parasites of Platyhelmintes : their morphology, developement, transmission and pathogenicity. CIH Miscellaneous publication, n° 2, 32 p.

CANNING E.U and BASCH P.F., 1968. - *Perezia helmnthorum* sp. nov., a microsporidian hyperparasitic of Trematode larvae from Malaysian snails. *Parasitology, 58* : 341-347.

COLLEY F., LIE K. and ZAMAN V., 1971. - Fine structure of the spore of *Perezia helmintherum (Microsporida ; Nosematidae). S.E. Asian J. Trop. Med. Pub. Health, 2* : 411.

COLLEY F., LIE K. and CHEONG W., 1971. - Experimental infection of Mosquito larvae with *Perezia helminthorum (Microsporida ; Nosematidae). S.E. Asian J. Trop. Med. Pub. Health, 2* : 411.

COLLEY F., LIE K., ZAMAN V. and CANNING E.U., 1975. - Light and electron microscopic study of *Nosema eurytremae* Canning 1972. *J. Invertebr. Pathol., 26* : 11-20.

COMPS M., GRIZEL H., TIGE G. et DUTHOIT J.L., 1975. - Parasites nouveaux de la glande digestive des Mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. *C.R. Acad. Sci., 281* : 179-181.

FIELD I., 1924. - Biology and economic value of the Sea Mussel *Mytilus edulis. Bull. U.S. Bureau Fish, 38* : 127-259.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J., COUSSERANS F., DUTHOIT J. et LE PENNEC M., 1974. - Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 240* : 7-30.

KUDO R., 1925. - Microsporida. *Science, 61* : 336.

LEGER L. DUBOSCQ O., 1909. - Sur les *Chytridiopsis* et leur évolution. *Arch. Zool. Exp. Gen., 1* : 9-13.

LEGER L. HOLLANDE A., 1917. - Sur un nouveau protiste à faciès de *Chytridiopsis*, parasite des ovules de l'Huître. *C.R. Soc. Biol., 80* : 61-64.

LIE K., COLLEY F., 1971. - Stages in the life-cycle of *Perezia helminthorum (Microsporida ; Nosematidae)* from the rediae of *Echinostoma malayanum. S.E. Asian J. Trop. Med. Pub. Health, 2* : 410-411.

MANIER J.F. et ORMIERES O., 1968. - Ultrastructure de quelques stades de *Chytridiopsis socius* Schn. parasite de *Blaps lithifera* Marsh. (Coléopt. Tenebr.). *Protistologica, 4 :* 181-185.

MICHELSON E.H., 1963. - *Plistophora husseyi* sp. n., a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snails. *J. Insect. Pathol., 5 :* 28-38.

MICHELSON E.M., 1976. - A potential intermediate host for *Schistosoma mansoni* from Haïti. *J. Parasitol., 62 :* 648-649.

RICHARDS C.S. and SHEFFIELD H.G., 1970. - Unique host relations and ultrastructure of a new microsporidian of the genus *Coccospora* infecting *Biomphalaria glabrata*. Proc. 4th Int. Colloq. Insect Pathol. and Soc. Invertebr. Pathol. College Park Md., 439-52.

SPRAGUE V., 1965. - Observations on *Chytridiopsis mytilovum* (Field), formerly *haplosporidium mytilovum* Field *(Microsporida ?). J. Protozool., 12 :* 385-389.

SPRAGUE V., 1970. - Some Protozoan parasites and hyperparasites in marine Bivalve Molluscs. Sp. Publ., *5*, Am. Fish. Soc. D.C.

SPRAGUE V., 1971. - Diseases of Oysters. *Ann. Rev. Microbiology, 25 :* 211 -230.

SPRAGUE V., 1972. - Classification of Microsporidia. Proc. 496th Meeting Helminthological Society of Washington, College Park.

SPRAGUE V., ORMIERES R. et MANIER J.F., 1972. - Creation of a new genus and a new family in the *Microsporida. J. Invertebr. Pathol., 20 :* 228-231.

VORONIN V.N., 1974. On parasitism of Microsporidians *(Microsporidia , Nosematidae)* in parthenogenetic generations and cercariae of Trematodes from freshwater Molluscs (en Russe). *Parazitologija, 8 :* 359-364.

WEISER J. 1961. - Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. *Monogr. Angew. Entomol., 17 :* 149 p.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 49 à 56

LES HAPLOSPORIDIES PARASITES DE MOLLUSQUES

par René Ormières (*) et Henri Grizel (**)

RESUME

Les auteurs passent en revue les Haplosporidies (parasites et hyperparasites de Mollusques : spores, cycles et action pathogène.

HAPLOSPORIDIA PARASITES OF MOLLUSCS

SUMMARY

A review of Haplosporidia (parasites and hyperparasites) of Molluscs : spores, life-cycle and pathogenicity.

Les haplosporidies ont une grande importance économique à cause des maladies qu'elles déterminent parfois chez les Mollusques comestibles, surtout chez les huîtres. Les maladies à Haplosporidies peuvent aboutir à la mort des hôtes.

Notre propos n'est pas de faire un historique détaillé, d'ailleurs déjà remarquablement fait par Sprague (1971) pour les parasites d'huîtres, mais une mise au point sur les Haplosporidies parasites de Mollusques en général. Elles appartiennent à 4 genres : *Minchinia*, *Haplosporidium*, *Marteilia* et *Urosporidium*, les trois premiers étant parasites, le dernier hyperparasite. Les éléments caractéristiques qui permettent de différencier les genres sont les spores.

SPORES, ESPECES ET HOTES

A. *Minchinia* Labbé, 1896

La spore de *Minchinia* (fig. A) est essentiellement composée d'une enveloppe sporale épaisse et d'un opercule (op) débordant largement l'enveloppe. Nous avons montré (Ormières et

(*) Station Biologique, 34200 Sète (France)
(**) Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, 56470 La Trinité sur Mer (France)

de Puytorac, 1968) que ces deux parties sont en continuité et qu'il existe une charnière permettant l'ouverture sporale. A l'intérieur de cette enveloppe, se trouve un sporoplasme (sp) uninucléé dont le cytoplasme renferme, outre les éléments classiques, deux organites particuliers : a) une grosse masse sphérique (s) la sphérule, située immédiatement sous l'opercule et constituée d'un réseau tortueux de membranes, assimilée à un corps de Golgi ; b) des corps denses aux électrons nommés par Perkins (1971) haplosporosomes (h), organites osmiophiles limités par une membrane et séparés en deux zones, un cortex et une médulla, par une zone claire. Autour de l'enveloppe sporale se trouve une couche constituée de cytoplasme.

Sont décrites dans ce genre :

- *Minchinia chitonis* (Lank., 1885) Labbé, 1896, dans le foie des Chitons *Acantochites fascicularis* L. et *Craspidochilus cinereus* L. Debaisieux (1919) mentionne sa présence dans le foie, les gonades, les branchies et le pied des Chitons.

- *Minchinia costalis* (Wood et Andrews, 1962) Sprague, 1963, parasite de l'huître *Crassostrea virginica* Gmelin des USA. Les spores non fixées mesurent 3,1 à 5,4 µ sur 3,0 à 4,6 µ (Perkins, 1969).

- *Minchinia dentali* (Arvy, 1949) Sprague, 1963, parasite de *Dentalium*.

- *Minchinia nelsoni* Haskin, Stauber et Mackin, 1966, se rencontre, comme *M. costalis* dans *Crassostrea virginica* des USA. Ses spores sont plus grandes (non fixées, 6,5 à 11,2 µ sur 4,5 à 6,5 µ).

- *Minchinia pickfordae* (Barrow, 1961) Sprague, 1963, trouvée aux USA dans la glande digestive de Gastéropodes d'eau douce, *Heliosoma*, *Physa* et *Lymnea*.

- *Minchinia* sp. Kern, 1976, dans les *Crassostrea gigas* de Corée.

B. *Haplosporidium* Lühe, 1900

La seule différence avec la spore de *Minchinia* résiderait dans la morphologie de l'appareil d'ouverture. L'opercule ne déborderait pas l'orifice et serait plus ou moins dans celui-ci (fig. 8).

Sont décrites dans ce genre :

- *Haplosporidium tumefacientis* Taylor, 1966, parasite de la glande digestive et du rein de *Mytilus californianus* (Californie.

- *Haplosporidium tapetis* Vilela, 1950, dans les branchies de *Tapes decussatus* (Portugal). Sprague (1963 - 1970) mentionne que la spore ressemble plus à une spore de *Nematopsis* qu'à celle d'une Haplosporidie.

C. *Urosporidium* Caullery et Mesnil, 1905.

La spore (fig. C) a la même allure que dans les deux genres précédents mais l'enveloppe cytoplasmique externe s'étend postérieurement en un prolongement important. L'opercule (op) est une lame mince qui s'étend sous l'orifice de l'enveloppe sporale. Les *Urosporidium* sont hyperparasites de larves de Trématodes ou de Nématodes, parasites de Mollusques.

Sont décrites dans ce genre :

- *Urosporidium constantae* Howell, 1967, dans les sporocystes du Trématode *Bucephalus longicornutus*, parasite d'*Ostrea lutaria* (Tasman Bay).

- *Urosporidium jiroveci* Ormières, Sprague et Bartoli, 1973, dans les sporocystes de *Gymnophallus nereicola* et dans un Trématode non identifié *(Monorchidae)*, parasite d'*Abra ovata* (Beauduc, France).

- *Urosporidium pelseneeri* (Caullery et Chappelier, 1906) Dollfus, 1925, des sporocystes de *Cercaria pectinata* dans *Donax vittatus* et *Barnea candida* (France).

- *Urosporidium spisuli* Perkins, Zwerner et Dias, 1975, dans des Nématodes immatures ressemblant à *Paranisakiopsis pectinis*, parasite de *Spisula solidissima* (Virginie, USA).

Urosporidium tauricum Zaika et Dolgikh, 1963, hyperparasite des larves de Trématodes *(Hemiuridae)*, parasitant *Rissoa splendida*.

Mackin et Loesch (1955) mentionnent deux Haplosporidies, une dans *Bucephalus cuculus* de *Crassostrea virginica*, l'autre dans un Trématode de *Donax variabilis*, dont on peut penser qu'elles appartiennent au genre *Urosporidium* (USA).

D. *Marteilia* Grizel et al., 1974

La spore (fig. D) de ce dernier genre diffère profondément de celle des trois genres précédents, au point que les premiers auteurs (Grizel et al., 1974) n'ont pas placé ce parasite parmi les Haplosporidies. Mais Perkins (1976), découvrant des haplosporosomes dans certains stades, pense qu'il s'agit bien d'une Haplosporidie d'un type nouveau. La spore qui n'a pas d'opercule contient, selon Perkins, trois sporoplasmes emboîtés, chacun étant inclus dans une vacuole.

Sont décrites dans ce genre :

- *Marteilia refringens* Grizel et al., 1974, dans divers tissus d'*Ostrea edulis* (Côtes atlantiques de France).

- *Marteilia sydneyi* Perkins et Wolf, 1976. Signalé par Wolf (1972) dans *Crassostrea commercialis* d'Australie, ce parasite vient d'être étudié par Perkins qui le rattache au genre *Marteilia*.

CYCLES

A. Cycle de *Minchinia*

Il a été établi par Farley (1967) pour *Minchinia nelsoni*, à partir d'observations en microscopie photonique. Tout le cycle se déroule dans l'hôte, du "germe" à la spore mûre. Il débute par un germe uni ou binucléé, logé dans les tissus de l'hôte, plus particulièrement dans les branchies (Farley, 1965-1967). Par de nombreuses mitoses, il multiplie ses noyaux et donne des plasmodes tandis que le tissu connectif et les sinus sanguins sont envahis. La prolifération se fait par la croissance de ces stades et la fragmentation de plasmodes en plasmodes paucinucléés qui s'accroissent à leur tour, puis finalement de désagrègent en éléments possédant un à cinq noyaux, les "gametic plasmodia" qui, à leur tour, fusionnent pour donner le stade prozygote. Les noyaux de ces derniers s'unissent deux à deux. Les stades à syncaryons peuvent migrer dans tous les tissus. A partir des noyaux ainsi obtenus, s'observent quelques mitoses donnant les noyaux des sporoblastes. Chaque noyau, avec une partie de cytoplasme environnant, s'entoure d'une enveloppe et le tout formera une spore uninucléée.

Les cycles d'*Haplosporidium* et d'*Urosporidium* doivent se rapprocher de celui-ci.

B. Cycle de *Marteilia*

Les travaux de Grizel et al. (1974 a et b) et de Perkins (1976) traitent de ce sujet : le cycle est différent de celui qui précède. La première figure observée chez les huîtres est une cellule renfermant une autre cellule. Grizel et al. les nomment respectivement cellules primaire et secondaire. Perkins semble considérer cet ensemble comme un plasmode *(plasmodium)*. Ensuite, selon les premiers auteurs, la cellulaire secondaire initiale se multiplie pour donner généralement huit cellules, chaque stade intermédiaire ayant été observé. D'après Perkins, la formation de ces cellules nommées presporanges se ferait par une multiplication rapide des noyaux, suivie d'un découpage cytoplasmique. La présence d'un plasmode initial reste donc très controversée, cette observation caractérisant, entre autres, les particularités de *M. refringens*. Par la suite, le noyau des cellules secondaires donne environ quatre noyaux qui, à leur tour, vont devenir noyaux de cellules enfermées dans les cellules secondaires : ce sont les cellules tertiaires de Grizel et al. ou les "spores *primordium*" de Perkins. Ces cellules tertiaires vont devenir des spores entourées d'une enveloppe plus ou moins épaisse. Après divisions nucléaires, ces spores vont être formées de trois sporoplasmes emboîtés (fig. D), alors qu'apparaissent, dans le cytoplasme non employé, de gros corpuscules réfringents. Le plus grand sporoplasme seul possède des haplosporosomes.

Il est assez difficile d'établir un parallélisme entre ce cycle et celui de *Minchinia* par exemple. Seule, la présence d'haplosporosomes a poussé Perkins à placer les *Marteilia* parmi les Haplosporidies.

ACTION PATHOGENE SUR LES MOLLUSQUES

Farley (1968) donne le processus suivi par la maladie provoquée chez *Crassostrea virginica* par *Minchinia nelsoni*. L'infection se fait par les branchies de l'huître et les palpes labiaux et se poursuit par le tube digestif. Ensuite, le tissu connectif est intensément envahi ainsi que les diverticules du tube digestif. Le tissu génital est souvent détruit. Petit à petit, tous les tissus présentent des altérations et se nécrosent.

La maladie de l'huître plate *(Ostrea edulis)* causée par *Marteilia refringens* se concrétise (Grizel et al., 1974) par l'arrêt de la croissance, la dépigmentation de la masse digestive et l'amaigrissement du Mollusque. Branchies et estomac sont peu affectés par la maladie. Les diverticules digestifs constituent le site privilégié du parasite. Ce dernier pourrait altérer le métabolisme des cellules, limitant ainsi les fonctions digestives de l'huître. De plus, une forte gène pourrait découler de l'oblitération des canaux digestifs par les nombreux stades parasitaires se trouvant dans les diverticules. L'hypothèse d'une sécrétion de substances toxiques par le parasite peut être aussi envisagée.

On sait que les sporocystes de Trématodes causent d'importants dommages à leurs hôtes Mollusques et un historique a été dressé à ce sujet par Howell (1967). Ces dommages, allant d'une apparence anormale de la masse viscérale à la destruction des gonades de l'hôte, peuvent aboutir à la mort de ce dernier. Mais, à leur tour, les sporocystes de Trématodes sont fortement affectés par les *Urosporidium* qui causent une complete ou partielle dégénérescence des cercaires en développement. Et Howell écrit : "the complete destruction by *H. constantae* of the embryonic cercariae may afford a method of biologically controlling the bucephalid infection of *Ostrea lutaria*". Dans le cas des *Urosporidium*, l'Haplosporidie aide le Mollusque en le débarrassant plus ou moins de ses parasites.

Parmi les parasites de Mollusques, les Haplosporidies constituent donc un groupe important tant par le nombre d'espèces connues que par les ravages qu'elles occasionnent parfois. Le cas des *Urosporidium* parasites de Trématodes de Mollusques est interessant, avec l'hypothèse d'une lutte biologique contre ces Vers souvent nuisibles.

REFERENCES

ARVY L., 1949. - Présentation de documents relatifs à l'ovogenèse chez le Dentale et à deux parasites de ce Scaphaopode : *Cercaria prananti* n. sp. et *Haplosporidium dentali* n. sp. *Bull. Soc. Zool., 74* : 292-294.

BARROW J.H., 1961. - Observations of a haplosporidian, *Haplosporidium pickfordi* sp. nov. in fresh water snails. *Tr. Amer. Micr. Soc., 80* : 319-329.

CAULLERY M. et CHAPPELIER A., 1906. *Anurosporidium pelseneeri* n.g. n. sp., haplosporidie infectant les sporocystes d'un Trématode parasite de *Donax trunculus* L. *C.R. Soc. Biol., 60* : 325-328.

CAULLERY M. et MESNIL F., 1905 - Recherches sur les Haplosporidies. *Arch. Zool. Exp., 4,* sér. (4), 101-180.

DEBAISIEUX P., 1919 - Quelques protozoaires parasites des Chitons et des Patelles. *C.R. Soc. Biol., 82,* 1400-1402.

DOLLFUS R. Ph., 1925 - Liste critique des cercaires marines à queue sétigère signalées jusqu'à présent. *Tr. St. Zool. Wimereux, 9* : 43-65.

FARLEY C.A., 1965 - Pathologic responses of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) to infection by the protistan parasite M.S.X. *Amer. Malacol. Union, Ann. rep.* : 23-24.

FARLEY C.A., 1966 - A proposed life-cycle of *Minchinia nelsoni (Haplosporida, Haplosporidiidae)* in the American Oyster *Crassostrea virginica. J. Protozool., 14* : 616-625.

FARLEY C.A., 1968 - *Minchinia nelsoni (Haplosporida)* Disease Syndrome in the American Oyster *Crassostrea virginica. J. Protozool., 15* (3) : 585-599.

GRIZEL H., COMPS M. COUSSERANS F. BONAMI J.R., VAGO C., 1974a- Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Sci., D, 279,* 783-784.

GRIZEL H. COMPS M. BONAMI J.R. COUSSERANS F. DUTHOIT J.L. LE PENNEC M.A., 1974b - Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L.*Bull. Inst. Pêches Mar. 240,* 7-30.

HASKIN H.H. STAUBER L.A. et MACKIN J.G., 1966 - *Minchinia nelsoni* n.sp. (*Haplosporida, Haplosporidiidae)*: causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic.*Science, 153 :* 1414-1416.

HOWELL M., 1967 - The Trematode *Bucephalus longicornutus* (Manter, 1954)in the New Zealand Mud-Oyster, *Ostrea lutaria. Trans. Roy. Soc. New Zeal., 8* :(22) 221-237.

KERN F.G. 1976 - Sporulation of *Minchinia* sp.(*Haplosporida, Haplosporidiidae)*in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) from the Republic of Korea. *J. Protozool. 23* (4) : 498-500.

LABBE A., 1896 - Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur les Coccidies. *Arch. Zool. Exp.,* 3° sér., *4 :* 533-608.

LANKESTER E.R. 1885 - Protozoa. *Encyclopaedia Britannica, 19,* 830-866.

LUHE M., 1900 - Ergebnisse der neueren Sporozoenforschung.*Zentr.Bakt. I. Orig.,28,* 384-392.

MACKIN J.G. et LOESCH H. 1955 - A haplosporidian hyperparasite of oysters. *Proc. Nat. Shellfish Assoc., 45,* 182-183.

ORMIERES R. et de PUYTORAC P., 1968 - Ultrastructure des spores de l'haplosporidie *Haplosporidium ascidiarum,* endoparasite du Tunicier *Sydnium elegans* Giard. *C.R. Acad. As., 266,* 1134-1136.

ORMIERES R. SPRAGUE V. et BARTOLI P., 1973 - Light and Electron Microscope Study of a New Species of *Urosporidium (Haplosporida),* hyperparasite of Trematode Sporocysts on the Clam *Abra. ovata. J. Invert. Path., 21,* (1) : 71-86.

PERKINS F.C., 1969. - Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen *Minchinia costalis (sporozoa, Haplosporida)*. *J. Parasot.*, *55* (5) : 897-920.

PERKINS F.O., 1971. - Sporulation in the Trematode hyperparasite *Urosporidium crescens* de Turk, 1940 *(Haplosporida : Haplosporidiidae)*. A, electron microscope study. *J. Parasit.*, *57* (1) : 9-23.

PERKINS F.O., 1976. - Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*. Taxonomic implications. *J. Protozool.*, *23* (1) : 64-74.

PERKINS F.O. et WOLF P.H., 1976. - Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n., Haplosporidan pathogen of Australian Oysters. *J. Parasit.*, *62* (4) : 528-538.

PERKINS F.O., ZWERNER D.E. et DIAS R.K., 1975. - The hyperparasite *Urosporidium spisuli* sp. n. *(Haplosporea)* and its effects on the surf Clam Industry. *J. Parasit.*, *61* (5) : 944-949.

SPRAGUE V., 1963. - Revision of genus *Haplosporidium* and Restoration of genus *Minchinia (Haplosporidia - Haplosporidiidae)*. *J. Protoz.*, *10* (3) : 263-266.

SPRAGUE V., 1970. - Recent problems of Taxonomy and Morphology of Haplosporidia. *J. Parasitol.* *56* (4) : 327-328.

SPRAGUE V., 1971. - Diseases of Oysters. *Ann. Rev. Microbiol.*, *25* : 211-230.

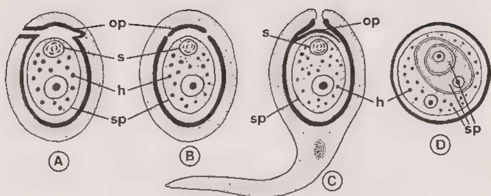
TAYLOR R.L., 1966. - *Haplosporidium tumefacientis* sp. n., the etiologic agent of a disease of the California Sea Mussel, *Mytilus californianus* Conrad. *J. Invert. Path.*, *8* : 109-121.

VILELA H., 1950. - Sporozoaires parasites de la palourde *Tapes decussatus* L. *Rev. Fac. Cienc. Lisbon*, ser. 2, *1* : 379-388.

WOLF P.H., 1972. - Occurance of a Haplosporidan in Sydney Rock Oysters *(Crassostrea commercialis)* from Moreton Bay, Queensland, Australia. *J. Invert. Path.*, *19* : 416-417.

WOOD J.L. et ANDREWS J.D., 1962. *Haplosporidium costale* (Sporozoa) associated with a disease of Virginia oysters. *Science*, *136* : 710-711.

ZAIKA V.E. et DOGIKH A.V., 1963. - A rare case of hyperparasitism of *Haplosporidium* of *Urosporidium tauricum* sp. n. partenites of Trematodes of the Family *Hemiuridae* Lühe from the Mollusc *Rissoa splendida* Eichw. (en Russe). *Zool. Zh.*, *42* : 1727-1729.



Légende de la figure

Spores d'Haplosporidies parasites ou hyperparasites de Mollusques : *A. Minchinia ; B. Haplosporidium ; C. Urosporidium ; D. Marteilia* (h. haplosporosomes, op. opercule, s. sphérule, sp. sporoplasme).

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 57 à 65

ON TWO NEW SPECIES OF COCCIDIA FROM THE MARINE BIVALVE, *TELLINA TENUIS* (DA COSTA) - AN ADELIORINE FROM THE RENAL ORGAN AND AN EIMERIORINE FROM THE OVARY.

by James S. Buchanan(*)

SUMMARY

The marine pelecypod, *Tellina tenuis*, occurs intertidally at densities as high as 5,000 per m^2 on sandy beaches around Europe. Two new species of coccidia are described from this bivalve. The first has intracellular stages in the kidney epithelia. Syzygy and sporogony were observed byt not merogony. Oocysts, 41 µm in diameter contained variable numbers of sporozoites, 6 µm in diameter, each containing 3 arcuate sporozoites and a residual body. The name *Klossia tellinae* n. sp. is proposed for this Adeleorine species. The second coccidian to be described occurs in the ovary having endogenous stages in the primary germ cells of the ovarian tubules. Males were not infected. Merogony, anisogamy and sporogony were observed and oocysts, 28.4 µm in diameter, contained 64 sporocysts 4.5 µm in diameter each containing 2 comma-shaped sporozoites. The name *Merocystis tellinovum* n.sp. is proposed for this Eimeriorine coccidian. The parasite brought about partial to complete loss of the reproductive potential of the female host owing to mechanical disruption of the primary germ cells. Approximately 90 % of females were found to be infected.

SUR DEUX ESPECES NOUVELLES DE COCCIDIES A PARTIR DU BIVALVE MARIN *TELLINA TENUIS* (DA COSTA) UN ADELIORINE DE L'ORGANE RENAL ET UN EIMERIORINE DE L'OVAIRE

RESUME

Le pelecypode marin *Tellina tenuis* se trouve périodiquement à des densités aussi élevées que 5000 par m^2 sur les plages sablonneuses de l'Europe. Deux espèces nouvelles de coccidies sont décrites chez ce bivalve. La première a des tades intracellulaires dans l'épithelium rénal. La syzygie et la sporogonie sont observées mais non la merogonie. Les oocytes de 41 µm de diamètre contiennent un nombre variable de sporozoites de 6 µm de diamètre chacun renfermant 3 sporozoites et un corps residuel. La dénomination *Klossia tellinae* n. sp. est proposée pour cette espèce Adeleorine. La deuxième coccidie à décrire se situe dans l'ovaire avec des tades intracellulaires dans les cellules germinales primaires des tubules ovariennes. Les mâles ne sont pas contaminés. La merogonie, l'anisogamie et la sporogonie sont observées et des oocystes 28,4 µm de diamètre renferment 64 sporocystes de 4,5 µm chacun contenant 2 sporozoites en forme de virgule. La dénomination *Merocystis tellinovum* n. sp. est proposée pour cette coccidie Eimeriorine. Le parasite provoque la perte partielle ou totale de la potentialité de reproduction de l'hôte femelle par la destruction mécanique des germes cellules germinales primaires. Environ 90 % des femelles ont été trouvées contaminées.

(*) Unit of Aquatic Pathobiology, University of Stirling, Scotland.

INTRODUCTION

Tellina tenuis da Costa is the overwhelmingly dominant member of the intertidal sand fauna of sheltered sandy beaches on Atlantic and North Sea coasts of Europe (Jones, 1950 and Thorson, 1955). The biology of this mollusc has been the subject of a number of studies over the past 50 years (Stephen, 1928, 1929a and b, 1931, 1932 ; Holme, 1949 ; Ansell and Trevallion, 1967 ; Trevallion and Ansell, 1967 ; Trevallion, Steele and Edwards, 1969 ; Trevallion 1971 ; Mc Intyre, 1970 and Barnett, 1971). A feature of the population dynamics of *Tellina tenuis* has been the wide fluctuations in recruitment and numbers from year to year. The biotic factors of disease and parasitism have recently been assessed in relation to this problem by Buchanan (1976) with special regard to the affects of parasitic castration on the condition index of females.

bservations of coccidia from marine bivalves are rare. To date, only the genera *Pseudoklossia* and *Hyaloklossia* have been described (Sprague, 1970) although recent observations by Perkins (1976) indicate that the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum* (= *Labyrinthomyxa marina*) is a protozoan in the subphylum Apicomplexa most closely related to the Sporozoasida. All species of coccidia listed by Sprague (1970) have anisogamy and sporogony in the kidney of the host. There appears to be no record of a coccidian from the eggs of any pelecypod although *Chytridiopsis ovicola* was treated by Dollfus (1921a) as an agent of coccidiosis in oysters. Sindermann (1970) believes it to be a Haplosporidan and Sprague (1970) argues that it belongs to the Microsporida on the basis of the ultrastructural observations of Manier and Ormieres (1968). *Chytridiopsis mytilovum* Field 1924 has been redescribed from *Mytilus edulis* by Sprague (1965) and *Mytilus galloprovincialis* by Vincentiis and Renzoni (1963). Becker and Pauley (1968) described a similar parasite to *Chytridiopsis* in the ova of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and Wolff (1977) has described an ovarian parasite of unknown taxonomic position from *Crassostrea echinata* in Northern Australia.

The life cycles for these two new species of coccidia from *Tellina tenuis* are described as far as they areknown and the pathogenic nature of these parasites is discussed. A diagnosis is presented based on the morphology of the oocysts. The terminology of Hammond (1970) and Levine (1973) has been adopted throughout.

MATERIALS AND METHODS

Tellina tenuis were collected from between the tide levels at Kames Bay, Millport, Isle of Cumbrae ; Aultbea, Loch Ewe and West Sands, St. Andrews, Fife. Specimens were fixed in Davidson's fluid and stained either with haematoxylin and eosin or the periodic acid-Schiff method of McManus according to established histological procedures. Sections were cut on a Leitz microtome and measurements were made with a calibrated ocular micrometer. Impression smears of kidney and gonad were fixed in absolute methanol and stained with Giemsa's.

OBSERVATIONS AND RESULTS

1) The life cycle of the Adeliorine coccidian from the renal organ.

Sporozoites were believed to penetrate the epithelial cells and to develop into rounded uni nucleate coccids. These differentiated to become gamonts. The paired gamonts were enclosed within a common envelope at the time of syzygy and this may have derived from the remnant of the host epithelial cell (Scholtyseck et al, 1977 and Fleischmann, 1977). Four microgametes were produced, one of which fertilized the macrogamont. Sporogony followed with the production of 32 or more sporocysts each containing 3 sporozoites and a residual body.

The name *Klossia tellinae* n. sp. is proposed for this species.

DIAGNOSIS (of sporulated oocysts, measured in µm)

Oocysts spherical to subspherical, 41 µm in diameter (40-42) (n=30), wall smooth, light yellowish brown, single layered. Micropyle, polar granules and residuum absent. Sporocysts spherical 6 µm (5-7) (n = 50) in diameter. No Stieda body, residuum granular and refractile body. 32 or more sporocysts per oocyst, each containing 3 arcuate sporozoites, 8 µm in length and 1 µm in width having a small refractile globule at the posterior end.

Habitat : Epithelia of renal organ

Type Host : *Tellina tenuis* (da Costa)

Location : Kames Bay, Millport, Isle of Cumbrae.

2) The life cycle of the Eimeriorine coccidian from the ovary.

Sporozoites were seen in the primary germ cells of the ovarian tubules. Schizogony gave rise to merozoites which infected other germ cells. After repeated schizogony, young merozoites developed into gamonts. Uninucleate macrogametes developed separately from the microgamont which produced swarms of spherical biflagellate microgametes. The zygote produced by karyogamy became an oocyst with 64 sporocysts each containing 2 comma-shaped sporozoites.

The name *Merocystis tellinovum* n.sp. is proposed.

DIAGNOSIS (of sporulated oocysts measured in µm)

Oocyst spherical to subspherical 27 µm (29-26) (n = 50) ; wall smooth colourless, double layered. Micropyle, oocyst residuum and polar granules absent. *Sporocysts* thin walled, spherical 4.2 µm (4.0-4.4) (n = 50) in diameter, each containing 2 comma-shaped sporozoites lying at right angles to each other with a pronounced refractile globule at the posterior end. Sporulated oocysts were slightly larger than unsporulated oocysts Monoxenous with merogony, gametogony and sporogony in the same host.

Habitat : Primary germ cells and oogonia

Type Host : *Tellina tenuis* (da Costa)

Location : Kames Bay, Millport, Isle of Cumbrae, Scotland

DISCUSSION

The genus *Klossia* Schneider of the family Adeleidae Leger contains several species each having numerous spherical spores each with three to ten sporozoites. *Klossia tellinae* most closely approaches this genus through its morphology and life cycle.

The genus *Merocystis* Dakin of the family Aggregatidae Labbe contains the single species *M. kathae* from the kidney of the whelk *Buccinum*. Merogony is unknown in *M. kathae* and the species is presumed heteroxenous. By contrast *Merocystis tellinovum* is considered to be monoxenous, however, this new species shares the common characteristics of two sporozoites per sporocyst with the genus *Merocystis*.

Long term population studies have shown that there has been little change in the density and distribution of *Tellina* populations known to be heavily parasitized by both species of coccidia (Buchanan, 1976). This suggests that there has been a long association between these intracellular parasites and the host. In the light of these findings it seems likely that marine pelecypod molluscs are host to numerous intracellular protozoa as yet-undescribed.

REFERENCES

ANSELL A.D. and TREVALLIO A., 1967 - Studies on *Tellina tenuis* (da Costa) I. Seasonal growth and biochemical cycle. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, *1*, 220-235.

BARNETT, P.R.O., 1971 - Some changes in intertidal sand communities due to thermal pollution. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, *177*, 353-364.

BECKER C.D. and PAULEY G.B., 1968 - An ovarian parasite (portista incertae sedis) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invert. Pathol.* *12*, 425-437.

BUCHANAN J.S., 1976 - Studies on some intracellular parasites of the marine bivalve, *Tellina tenuis* (da Costa). Ph. D. Thesis, University of Stirling.

DOLLFUS, R. Ph., 1921 - Resumé de nos principales connaissances pratiques sur les maladies et les ennemis de l'huitre. *Notes Mem. Off. Sci. Tech. Pêches Marit. 4*, 46 pp.

FLEISCHMANN B., 1977 - Elektronenmikroskopischer Beitrag zum Parasit-Wirt-Verhältnis des Coccids *Klossia helicina* (Coccidia ; Adeleidea) Ph. D. Thesis. Zoologischen Institut der Universität Bonn.

HOLME N.A., 1950 - Population dispersion in *Tellina tenuis* (da Costa). *J. mar. biol. Ass. U.K.* *29*, 267-280.

HAMMOND D.M., 1970 - The development and ecology of coccidia and related intracellular parasites. In : Ecology and Physiology of Parasites - a Symposium, ed., A.M. Fallis. University of Toronto.

JONES N.S., 1950 - Marine bottom communities. *Biol. Reviews 25*, 283-313.

LEVINE N.D., 1973 - Introduction, History and Taxonomy. In : The Coccidia ed. D.M. Hammond. University Park Press, Baltimore and Butterworths, London.

MANIER J.F. and ORMIERES R., 1968 - Ultrastructure de quelques stades de *Chytridiopsis socius* Schn. Parasite de *Blaps lethifera* Marsh (Coleopt. Tenebra). *Protistologica, 4*, 181-185.

McINTYRE A.D., 1970 - The range of biomass in intertidal sand with special reference to the bivalve *Tellina tenuis* (Da Costa). *J. mar. biol. Ass. U.K., 50*, 561-575.

PERKINS F.O. ,1976 - Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum* L. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *J. Parasitol., 62*, 959-974.

SCHOLTYSECK E., FLEISCHMANN B. and MOLTMANN U., 1977 - Studies on *Klossia helicina* and *Klossia* sp. Colloque International de Pathologie et Parasitologie des Mollusques. Centre Universitaire, Perpignan. p 22.

SINDERMANN C.J. 1970 - Principle diseases of marine fish and shellfish. *Academic Press, N.Y. and London.* 369 pp.

SPRAGUE V. 1965 - Observations on *Chytridiopsis mytilovum* (Field) formerly *Haplosporidium mytilivum* (Field) (Microsporida). *J. Protozool., 3*, 385-389.

SPRAGUE V. 1970 - Some Protozoan parasites and hyperparasites in marine molluscs. In : Symposium on diseases of fishes and shellfishes. ed. S.F. Snieszko. *Am. Fish. Soc., sp. Publ. 5*, Washington D.C.

STEPHEN A.C. 1928 - Notes on the biology of *Tellina tenuis* (da Costa). *J. mar. biol. Ass., XV :* 683-702.

STEPEN A.C. 1929a - Studies on the Scottish marine fauna - the fauna of sandy and muddy areas of the tidal zone. *Trans. Roy. Soc. Edin.*LVI : 291-306.

STEPHEN A.C. 1929b - Notes on the rate of growth of *Tellina tenuis* (da Costa) in the Firth of Clyde. *J. mar. biol. Ass. XVI* : 117-129.

STEPHEN A.C. 1931 - Notes on the biology of some lamellibranchs on the Scottish coast. *J. mar. biol. Ass. (N.S.) 17* : 277-300.

STEPHEN A.C., 1932 - Notes on the biology of some lamellibranchs in the Clyde area. *J. mar. biol. Ass. (N.S.) 18* : 51-68.

THORSON G. 1955 - Modern aspects of marine level-bottom animal communities. *J. mar. Res. 14* : 387-397.

TREVALLION A. and ANSELL A.D. 1967 - Studies on *Tellina tenuis* (da Costa) II. Preliminary experiments in enriched sea water. *J. exp. mar. Biol. Ecol., 1* : 257-270.

TREVALLION A., STEELE J.H. and EDWARDS R.R.C., 1969 - Dynamics of a benthic bivalve. In : Marine Food Chains, Ed. J.H. Steele. Oliver et Boyd. Edinburgh.

TREVALLION A., 1971 - Studies on *Tellina tenuis* (da Costa) III. Aspects of general biology and energy flow. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 7 : 95-122.

de VINCENTIIS M. and RENZONI A., 1963 - Sulla presenza di uno sporozoo in ovociti di *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Arch. Zool. Ital.* 47 : 21-26.

WOLF P.H., 1977 - Diseases and parasites in Australian commercial shellfish. 1er Colloque International de Pathologie et Parasitologie des Mollusques, Centre Universitaire Perpignan ' Haliotis, 6.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a postgraduate research grant from the Natural Environmental Research Council. I wish to thank my colleagues at the Unit of Aquatic Pathobiology, Stirling University for their helpful advice and technical assistance.

PLATE CAPTIONS (A)

Fig. 1 - Low power (x50) light micrograph of the kidney (at top) containing numerous paired gamonts of *Klossia tellinae* free in the lumen following mechanical disruption of the host epithelial cells. A mass of sporulating oocysts and host amoebocytes is arrowed. The ovarian tubule at the bottom contains oocysts of *Merocystis tellinovum*.

Fig. 2 - A portion of the Kidney of *Tellina tenuis* (X 100) with, arrowed, paired gamonts at syzygy of *Klossia tellinae*.

Fig. 3 - Detail of the kidney (X 250) showing sporulated oocysts and micro- and macrogamonts at syzygy (arrowed).

Fig. 4 - Detail from 3. The remnants of the host epithelial cell surrounds the gamonts at syzygy. Sporocysts, each containing 3 arcuate sporozoites and a refractile residual body can be seen at top right.

Fig. 5 - Squash preparation of a mature oocyst of *Klossia tellinae*. A single layered wall surrounds the sporocysts. The sporozoites are 8 µm in length.

Fig. 6 - Giemsa stained sporocysts each with three sporozoites and a residual body. The mean width of the sporocysts is 6 µm.

PLATE CAPTIONS (B)

Fig. 1 - The gonadal tubules (arrowed) show white when packed with dense masses of the oocysts of *Merocystis tellinovum*. X 10.

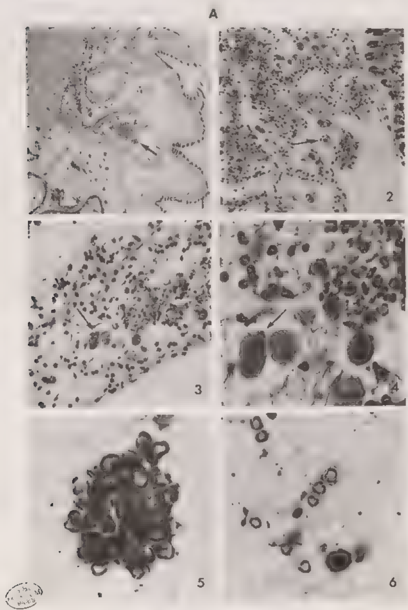
Fig. 2 - Low power light micrograph of the ovarian tubules packed with coccidian oocysts. Note the heavy infiltration of amoebocytes.X 100.

Fig. 3 - Endogenous stages of *Merocystis tellinovum*. Sporozoites are dividing by schizogony within the primary germ cells (arrowed) to produce numerous merozoites which will infect other germ cells. An uninfected host oocyte can be seen at centre. Periodic acid-Schiff's stain, magnification X 400.

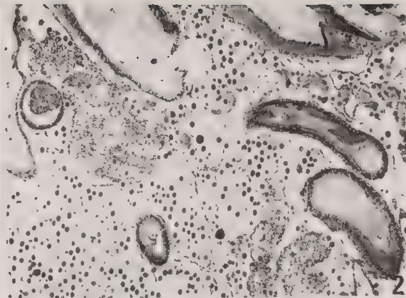
Fig. 4 - After repeated schizogony, young merozoites develop into gamonts. In this photomicrograph a microgamont (arrowed) is producing swarms of spherical biflagellate microgametes. The macrogamont (at centre) has stained densely PAS positive. The two lower primary germ cells contain merozoites.

Fig. 5 - Mature oocysts, micro- and macrogamonts are shown at various stages of their development. The microgamont (arrowed) is surrounded by immature microgametes.

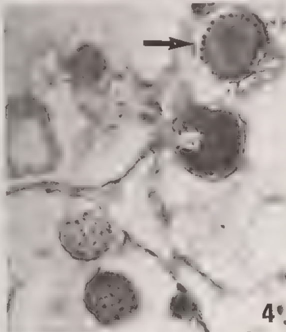
Fig. 6 - This phase contrast light micrograph of a squash preparation of *Merocystis tellinovum* oocysts shows numerous sporocysts each containing 2 comma shaped sporozoites each 3 µm in length. X 400.

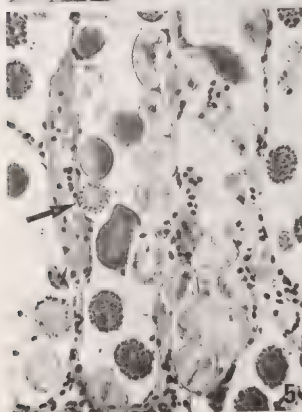


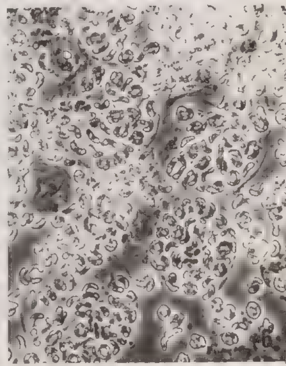

1


2


3


4


5


6

Haliotis, 8 , 1977,(1979)
p. 67 à 73

STUDIES ON *KLOSSIA HELICINA* AND *KLOSSIA* SP.

by E. Scholtyseck(*) (a), B. Fleischmann(*) (b), U. Moltmann(*) (c)

SUMMARY

A light- and electron microscope study has been made on the life cycle of *Klossia helicina* from the epithelial cells of the kidney of the pulmonate snail *Cepaea nemoralis* and of *Klossia* sp. from *Succinea putris*. For the first time the fine structure of the schizonts and merozoites of *K. helicina* has been analyzed. The mucous layer surrounding the intracellular stages of the parasite (schizonts, gamonts) has been established as a typical parasitophorous vacuole. In previous studies this layer was considered as a part of the parasite cell. Regarding the formation of syzygy it has been suggested that in *K. helicina* a real syzygy does not exist, because the male and female partners have no pellicular contact as they are separated by their parasitophorous vacuoles. In *Klossia sp.* the formation of binucleate sporoblasts from a multinucleate sporont has been described. The life cycle of this species has been presented diagrammatically.

ETUDES SUR *KLOSSIA HELICINA* ET *KLOSSIA* SP.

RESUME

Une étude de microscopie optique et électronique a été réalisée sur le cycle de *Klossia helicina* à partir des cellules épithéliales du rein de l'escargot pulmoné *Cepaea nemoralis* et de *Klossia* sp de *Succinea putris*. La structure fine des schizontes et des merozoites de *K. helicina* a été analysée la première fois. La couche de mucus entourant les stades intracellulaires du parasite (Schizontes, gamontes) a été reconnue d'être une vacuole parasitophore typique. Dans des études antérieures cette couche a été considérée comme une partie de la cellule du parasite. Au sujet de la formation de syzygie il est suggéré que chez *K. helicina* il n'existe pas une réelle syzygie parce que le mâle et la femelle n'ont pas de contact car ils sont séparés par leurs vacuoles parasitophores. La formation de sporoblastes binuclée à partir d'un sporonte multinuclé est décrite chez *Klossina* sp. Le cycle de cette espèce est présenté sur diagramme.

(*) Abteilung für Protozoologie, Zoologisches Institut der Universität, Poppelsdorfer Schloss,5300 Bonn (Allemagne).

(a) Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft

(b) Dissertation of the University of Bonn, 1977 : Elektronen-mikroskopischer Beitrag zum Parasit-Wirt-Verhältnis des Coccids *Klossia helicina* (Coccidia ; Adeleidea)

(c) Diplom-thesis of the University of Bonn, 1976 : Der Entwicklungsgang von *Klossia* spec. (Coccidia, Adeleidea) aus der Schnecke *Succinea putris*.

INTRODUCTION

The adelid coccidian *Klossia helicina* was first found in the epithelial cells of the kidney of *Helix pomatia* by H. Kloss in the year 1855. Schneider (1875) gave it the taxonomic position among the "psorospermies". Light microscope studies on *K. helicina* have been made by numerous authors (Wolters, 1891 ; Laveran, 1898 ; Debaisieux, 1911 ; Naville, 1927 ; Wurmbach, 1935 ; Nabih, 1938 ; Scholtyseck, 1963 ; Leibenguth, 1971). First electron microscope studies on this adelid coccidian have been performed in the Section of Protozoology of the University of Bonn (Volkmann, 1966 ; 1967 ; Scholtyseck, Volkmann, Hammond, 1966 ; Schulte, 1969 ; Moltmann,1976 ; Fleischmann, 1977). In these publications the ultrastructure of the gamogony stages as well as the distribution of acid phosphatase and polysaccharide and enzyme activities on the fine structures were investigated. In the present paper the ultrastructure of the schizonts, the merozoites, the syzygy and the sporonts is described for the first time.

MATERIAL AND METHODS

Pulmonate snails, *Cepaea nemoralis* and *Succinea putris*, were collected in Bonn and Tübingen respectively. The *C. nemoralis* snails were infected with *Klossia helicina* ; the *Succinea putris* snails showed infections with *Klossia* sp.. The pulmonate molluscs were killed, their kidneys removed and fixed in glutaraldehyde, postfixed in OsO_4, dehydrated in acetone and embedded in Vestopal W. Electron micrographs were made with a Zeiss electron microscope EM 9A.

RESULTS

Life cycle

The life cycle of *Klossia* sp. is shown diagrammatically in Fig. 1. The entire course of development takes place in the kidney epithelium of the pulmonate snail *Succinea putris*. After schizogony (merogony) has been repeated several times (1-6), the gamonts arise and arrange themselves in pairs (7-9). The macrogamonts develop into large macrogametes (110 µm in diameter), while the nucleus of the adhering lens-shaped microgamont undergoes two divisions (10, 11). Unfortunately, the formation of the four microgametes was not observed. After fertilization (12), numerous spherical spores, containing four sporozoites, are formed in the oocyst during sporogony (13-16).

Fine structure of merozoites

For the first time the fine structural features of the *Klossia* merozoites were described by Fleischmann (1977). These motile stages are represented in Fig. 2, showing a merozoite of *K. helicina* in longitudinal and transverse sections. The *Klossia* merozoites

possess the principal fine structures of sporozoan merozoites. These are mostly located in the frontregion of the cell and form the so-called "apical complex". They include the pellicle (PE), polar ring (P), micropores (MP), conoid (C), micronemes (MN) and rhoptries (RH). Up to 15 rhoptries are observed, the content of which is granulated. Only their ductules (DRH) extending into the conoid area are homogeneous osmophilic. Beneath the three-membranous pellicle about 70 microtubules (MT) are running from the anterior end posteriorly as far as the nucleus (N). This is situated in the middle of the longitudinally stretched cell and bounded by a normally structured perinuclear space. Mostly, a compact nucleolus (NU) is present. Contrary to other sporozoan merozoites more than one dictyosome of the Golgi apparatus (GO) lie next to the anterior surface of the nucleus. Membrane-bounded ovoidal bodies containing a variety of nondescript structures are observed mostly in the posterior cell region. They may represent the so-called protein granules (PG), Lipid inclusions (L), amylopectin granules (A), parts of the rough endoplasmic reticulum (ER) and sections through the mitochondrion (MI) with tubular structures inside are distributed throughout the cytoplasm. In some cases thick-walled vesicles, obviously Golgi adjuncts (GA), are visible.

Fine structure of the syzygy stage

The infectious as well as the stationary stages of *Klossia* sp. have a sporozoan pellicle (PE) as is demonstrated by the shown macrogamete (MAG) and the microgamont (MIG) which have formed a syzygy. In the pellicle are numerous micropores (MP). The cytoplasm is filled with many inclusions. The amylopectin granules (A) appear particularly electron-light and are as prominent as the so-called grey bodies (GB) which are mainly concentrated in the peripheral region. Apart from these inclusions fat droplets (L) are found. Numerous dictyosomes (GO) lie randomly in the cytoplasm, while the tubular mitochondria (MI) are found mostly at the periphery. The nucleus (N) with a compact nucleolus (NU) is near the marginal zone where the microgamont is situated. The macrogamete lies in a well-developed parasitophorous vacuole (PV) of a stretched host cell (HC) which shows mitochondria (MIH) and microvilli (MV). The parasitophorous vacuole is filled with granular material and separated by a pellicle-like layer (MC) from the host cell. This limitation comprises three membranes, as the pellicle of the parasite cell. The microgamont has rhoptries (RH), micronemes (MN), mitochondria (MI), a Golgi apparatus (GO), and amylopectin inclusions (A). It is located in its own parasitophorous vacuole (PV). The boundaries of the two parasitophorous vacuoles are fused where they meet. Therefore there is no direct cellular contact between the two sizygy partners.

DISCUSSION

The most interesting result of this study seems to be the spatial relationship of the two gamonts of the syzygy. In the gamont pair of gregarines there is a pellicular contact between the two partners. This is typical of gamontogamy. In the two gamonts of *Klossia*, both partners are lying in their own parasitophorous vacuoles and have no direct cellular contact. This phenomenon should be studied in other adelid coccidia since the syzygy stage is an important characteristic of the adelid group (Grell, 1973 ; Scholtyseck, 1979).

REFERENCES

DEBAISIEUX P., 1911 - Recherches sur les Coccidies. I. *Klossia helicina* (Schneider). *Cellule, 27,* 89-111.

FLEISCHMANN B., 1977 - Elektronenmikroskopischer Beitrag zum Parasit-Wirt-Verhältnis des Coccids *Klossia helicina* (Coccidia ; Adeleidea). Dissertation of the University of Bonn.

GRELL K., 1973 - Protozoology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

KLOSS H. 1855 - Über Parasiten in der Niere von Helix. *Abh. Senckenb. naturforsch. Ges., 1,* 189-213.

LAVERAN A., 1898 - Sur les modes de reproduction du *Klossia helicina. C.R. Soc. Biol., Paris, Ser. 4, vol. 5,* 1083-1086.

LEIBENGUTH F., 1972 - Mikrospektrophotometrische Untersuchungen zur Kernhypertrophie nach Infektion mit *Klossia helicina. Z. Parasitenk., 39,* 211-220.

MOLTMANN L., 1976 - Der Entwicklungsgang von *Klossia spec.* (Coccidia, Adeleidea) aus der Schnecke *Succinea putris* . Diplom-thesis of the University of Bonn.

NABIH A., 1938 - Studien über die Gattung *Klossia* und Beschreibung des Lebenscyclus von *Klossia loosi* (n. sp.). *Arch. Protistenk., 91,* 471-515.

NAVILLE A., 1927 - Recherches sur le cycle évolutif et chromosomique de *Klossia helicina* (A. Schneider). *Arch. Protistenk., 57,* 427-471.

SCHNEIDER A., 1875 - Note sur la psorospermie oviforme du poulpe. *Arch. Zool. exper. gén. IV. Notes et Revue* XIII ; XL-XLV Paris.

SCHOLTYSECK E., 1963 - Vergleichende Untersuchungen über die Kernverhältnisse und das Wachstum bei Coccidiomorphen unter besonderer Berücksichtigung von *Eimeria maxima*. *Z. Parasitenk.*, *22*, 428-474.

SCHOLTYSECK E., 1979 - Fine structure of Parasitic Protozoa. An atlas of Micrographs, Drawings and Diagrams. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York.

SCHOLTYSECK E., VOLKMANN B. und HAMMOND D.M., 1966 - Spezifische Feinstrukturen bei Parasit und Wirt als Ausdruck ihrer Wechselwirkungen am Beispiel von Coccidien. *Z. parasitenk.*, *28*, 78-94.

SCHULTE E., 1969 - Cytochemische Untersuchungen an den Feinstrukturen von *Klossia helicina* (Coccidia, Adeleidea), Diss. Bonn.

VOLKMANN B., 1966 - Vergleichend elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien von *Klossia helicina* (Coccidia, Adeleidea) Diss. Bonn.

VOLKMANN B., 1967 - Vergleichend elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien von *Klossia helicina* (Coccidia, Adeleidea). *Z. Parasitenk.*, *29*, 159-208.

WOLTERS M., 1891 - Die Conjugation und Sporenbildung bei Gregarinen. *Arch. f. mikroskop. Anat.*, *37*, 99-138.

WURMBACH, H., 1935 - Über die Beeinflussung des Wirtsgewebes durch *Aggregata octopiana* und *Klossia helicina*. *Arch. Protistenk.*, *84*, 257-284.

LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1 : Diagrammatic représentation of the life cycle of Klossia sp. from the kidney epithelium of the pulmonate snail Succinea putris (from Moltmann, 1976).

Fig. 2 : Klossia helicina ; diagram of a merozoite to show the fine structure in longitudinal and transverse sections (from Fleischmann, 1977).

Fig. 3 : Klossia helicina; drawing after an electron micrograph of a syzygy stage (from Fleischmann, 1977).

A Amylopectin
C Conoid
DRH Ductule of rhoptry
ER Endoplasmic reticulum
GA Golgi adjunct
GB Grey body
GO Golgi apparatus
HC Host cell
HCN Host cell nucleus
L Lipid inclusion
MAG Macrogamete
MC Three-membranous complex
MI Mitochondrion
MIG Microgamont
MIH Host cell mitochondrion
MN Micronemes
MP Micropore
MT Microtubules
MV Microvilli
N Nucleus
NU Nucleolus
P Polar ring
PE Pellicle
PG Protein granule
PV Parasitophorous vacuole
RH Rhoptries
V Vesicle

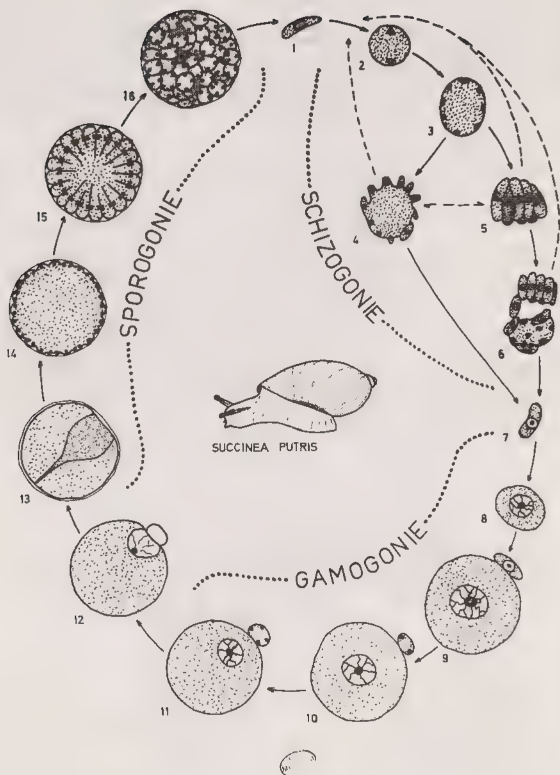
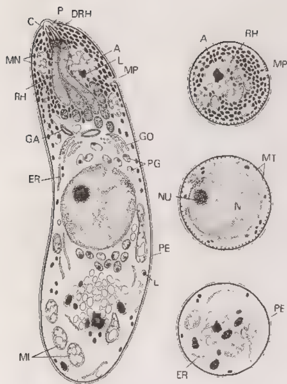

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
SCHIZOGONIE
SPOROGONIE
GAMOGONIE
SUCCINEA PUTRIS

Figure 1


P
C
DRH
MN
A
L
MP
RH
GA
GO
PG
ER
PE
L
MI
A
RH
MP
MT
NU
N
PE
ER

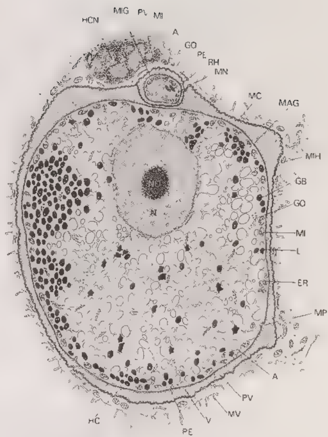

HCN
MIG
PV
MI
A
GO
PE
RH
MN
MC
MAG
MIH
GB
GO
MI
L
ER
MP
N
A
PV
MV
V
PE
HC

Fig res et 3



Haliotis, 8, 1977.

DISEASES AND PARASITES IN AUSTRALIAN COMMERCIAL SHELLFISH

by Peter H. Wolf (*)

SUMMARY

Although some progress in the study of "winter mortality" was made, we have been unable to find the causative organism, which is responsible for this condition.

The epizootic in the northern oysters was identified as *Marteilia sydneyi*. Research is in progress to learn more about this haplosporidan parasite.

Tylocephalum was found to parasitize the Australian oysters in the warmer regions of the continent. A possible coccidian parasite was found to have a castrating effect on the tropical oyster, *C. echinata* in the Northern Territory. Both parasites do not cause mortalities, and are not of great economic importance.

The unknown parasite, which causes high mortality in the pearl oyster, *Pinctada maxima* is presently under electron microscope investigation.

Finally, the epitheliomas, found very rarely in *C. commercialis*, are being investigated at the Smithsonian Institution in Washington, D.C.

MALADIES ET PARASITES DES COQUILLAGES AUSTRALIENS COMMERCIALISES

RESUME

Pour la "mortalité d'hiver", malgré quelques progrès dans l'étude étiologique, l'agent causal n'a pas pu être mis en évidence.

L'épizootie dans les huîtres du nord a pu être attribué à *Marteilia sydneyi*. Les travaux sont en cours pour connaitre davantage cette haplosporidie parasite.

Tylocephalum a été trouvé comme parasite des huitres australiens dans les régions chaudes. Une coccidie favorite a un effet de castration pour l'huitre tropicale *C. echinata* dans les régions du Nord. Ces deux parasites ne causent pas de mortalité et n'ont pas une grande importance économique.

Un parasite non identifié causant une mortalité élevée parmi l'huitre perlière *Pinctada maxima* est en cours d'étude en microscopie électronique.

Enfin, les épithélium, très rarement trouvés chez *C. commercialis* sont étudiés au Smithisonian Institution à Washington.

(*) Scientific Section, New South Wales State Fisheries, 211 Kent Street Sydney., N.S.W., 2000, (Australia).

INTRODUCTION

The cultivation of the Australian edible oyster, *Crassostrea commercialis*, *(Saccostrea commercialis)*, is concentrated to the East coast of the continent in New South wales, and represents at present a value of some 15 million dollars U.S. (= about 73 million French francs) per annum. Other species, such as *Crassostrea echinata* and *Crassostrea amasa* of the tropical regions are not cultivated, but only collected from rocks and mangroves, and represent only a minor value. It has been therefore *C. commercialis* which has been investigated in detail.

WINTER MORTALITY

The main problem in the New South Wales oyster industry is a condition, commonly known as "winter mortality", killing up to 70 % of the oyster crop. Geographically, winter mortality is confined to the middle and southern part of the New South Wales coast, and takes epidemic proportions in Autumns and Winters with low rainfall. After a wet Autumn and early Winter, this condition is either very low or absent.

Roughley (1926) has studied the disease and found that infected oysters did display inflammatory regions within their bodies, ulcerations on the epithelium of the labial palps, the gills, mantle and gonads, but also abscesses in the stomach wall, intestine and stylus sac. Histological sections did not reveal any bacteria or fungi or other microparasites.

So far we have not been able to locate or find a causative organism but believe that the disease could be due to a virus and to the physiological stress conditions brought about by our cultivation techniques. The fact that wild, uncultivated stock does not suffer from winter mortality, or at least not to such an extent, gives us reason to believe it. The disease is very similar to the Canadian "Malpeque" disease with one noted exception, in that "Malpeque" disease infects all oysters at a younger age, and mortality occurs in the first and second Winters with a survival rate of about 2 % after that time. Australian winter mortality on the other hand attacks chiefly mature oysters during the third Winter, just before marketing.

MARTEILIA SYDNEYI

In the last 8 years 4 parasites, some of them in epidemic proportions, were found in Australian commercial shellfish. The discovery of the parasites coincided with the creation of an oyster pathology section of the New South Wales State Fisheries, which in turn started sampling regularly in all New South Wales estuaries, and also in some of the estuaries of other states.

In 1971 we were able to find a hitherto unknown haplosporidian parasite in our commercial oyster. (Wolf, 1972). Sprague (pers. comm.) drew our attention then to a recently discovered very similar parasite in the French oyster, which he had seen when working with Comps (Comps 1969). Comparing histological sections during a visit to Sete, we were able to establish that the two parasites were similar, but not identical. Final proof was obtained when Grizel et al. (1974) in France and Perkins in U.S.A. examined the respective tissues under the electron microscope, and found that both parasites were species not previously described, namely *Marteilia refringens* in the French, and *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster (Grizel et al, 1974, Perkins et Wolf, 1976). The haplosporidian in Australia was not confined to the one host species ; at least one case was found in which the parasite had invaded the tropical oyster *C. echinata*. However it can be stated that indications are that the parasite is confined to the sub-tropical an tropical region north of Lat. 29°S. In the last 4 years we have been able to establish several facts about this parasite, namely the development of the spores within the digestive glands of the host, the division of the spores to 2, 4,8,16 and more spores, the development of the refringent bodies,and the shedding of the spores into the luminae of the digestive glands, when ripe (Fig. 1). We also found, by regular sampling methods in affected estuaries, that the incubation period of the parasite in the host is less than 60 days from early infection to the death of the host.
At present we are contemplating experiments to find out the following :

- Salinity tolerance of the parasite, which does, it appears, prefer lower salinities at least for a part of its development.

- To adapt our intertidal cultivation methods to avoid the parasite. It appears that higher growing levels in the intertidal zone which we normally use will avoid the parasitic invasion, or at least reduce its numbers.

- Since around 20 % of oysters in epidemic areas do survive without showing any signs or little signs of infection, it is thought that from these a resistant strain could be developed by selectively using stock which has been exposed repeatedly to the disease, but had not been infected.

The importance of this research can be understood if one considers that up to 80 % of the oysters in Southern Queensland and Northern New South Wales are lost during severe epidemic outbreaks of this pathogen.

TYLOCEPHALUM

The second parasite is much less harmful and does not cause mass mortalities. *Tylocephalum* sp., a larval tapeworm, was first described in the pearl oyster *Pinctada maxima* from Ceylon, later by Sparks and Cheng in the American oyster *Crassostrea virginica* from Hawaii and Florida (Sparks, 1963 and Cheng, 1966), and recently from the sub-tropical and tropical oysters from Australia (Wolf, 1976). Again it has not been found so far in oysters from south of the 30 th parallel.

Up to 36 cysts in various stages of resorption were seen in histological transverse sections of infected oysters (Fig. 2). The resorption of the parasite by the host has been described by Cheng (Cheng and Rifkin, 1972).

No mortalities caused by *Tylocephalum* have been reported. However, the strain on the infected animal in resorbing the many cysts obviously causes the condition of the oysters to deteriorate and badly infected oysters are hardly marketable.

PARASITIZED PEARL OYSTERS

The third parasite, recently found, occurs in the Pearl oyster *Pinctada maxima* from Northern Australia. *P. maxima* produces the large cultured pearls, and up to 50 % of the pearl oysters die on the rafts onto which they have been placed after having been collected on the pearling grounds by the pearl divers.

It was reported that the first indication of infection is the shrinking of the mantle and cessation of feeding. Freshly fixed material from both infected and uninfected specimens was obtained. A very small spherical body (mean size 2.8 µm) was found in large quantities within the digestive tubules, staining very faintly yellow in preparations made with Harris' haematoxylin and eosin. Various staining techniques were used and it was found that Delafield's haematoxylin, Safranin O, Acridine Orange (examined under ultra-violet light) and finally Grocott's Fungus stain were the most suitable stains. (Fig. 3). The organism is P.A.S. positive. Some tissue samples, fixed for electron microscopy in glutaraldehyde, were obtained from the pearl farm after an epidemic outbreak, but associated with the great transport difficulties from the far North of Australia to Virginia, U.S.A., extremes of temperature had left the tissue samples in an unsatisfactory state and unclear pictures resulted from this first effort. It is therefore at present impossible to place the parasite taxonomically, but indications are that it is a fungus (Wolf and Sprague, in press).

OVARIAN PARASITES

Lastly there has to be noted a very interesting parasite which causes no disease to its host *Crassostrea echinata* from the Northern Territory (Darwin Harbour) of Australia,

by parasitizing the ripe and developing ova of this species. One or two spherical cysts, each of which is divided in half by a membrane, harbouring one very small parasite, occur in most eggs of this species (Fig. 4). Since no mortalities have been reported from this area, and the infection reached up to 60 % of the oysters, it is hard to believe that any mass mortality would have gone unnoticed. Furthermore, the tissue of the body, as well as the condition of the infected oysters, were such that death would have been unlikely. It is believed that the parasite uses the ova of the infected host simply as a vector for distribution, but obviously with a castrating effect (Wolf, 1977). The taxonomy of this parasite is equally unknown, but it is believed to be a coccidian (Levine, pers. comm.).

NEOPLASMS IN OYSTERS

Although their incidence of occurrence is very low (1:2000) and hence not of eonomic importance, neoplastic growths and hematopoietic neoplasms are considered very important in the research of tumours in lower animals. The epitheliomas occur only on or around the mantle lobes of the affected animals and have been found in various sizes from 1 mm to 18 mm in diameter (Fig. 5), (Wolf, 1969, 1971 and 1976). Three cases of multiple tumours in the pericardial cavity of *C. commercialis* are known and described (Dinamani and Wolf, 1973) and 3 cases of a haemotopoietic neoplasm in *C. commercialis* were found (Figs. 6, 7). At present some of the papillary epitheliomas are being studied under the electron microscope at the Registry for Tumors in Lower Animals at the Smithsonian Institution.

At least one case of haemotopoietic neoplasm was fixed with glutaraldehyde for electron microscope examination.

REFERENCES

CHENG T.C., 1966 - On the structure, mode of infection, and fate of *Tylocephalum* in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellf. Assoc.*, *56*, 1.

CHENG T.C. and RIFKIN E., 1970 - Cellular reaction in marine Molluscs in response to Helminth parasitism. Symposium in Diseases of fishes and shellfishes, *Am. Fish. Soc.*, *Special Publication N°5*, 443-496 .

COMPS M. 1970 - Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huitres plates dans le Bassin de Marennes. *Rev. Trav. Inst. Peches marit.*, *34*, (3), 317-326.

DINAMANI P. and WOLF P.H. 1973 - Multiple tumors in the pericardial cavity of an australian rock oyster, *Crassostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Int. J. Cancer*, *11*, 293-299.

GRIZEL H. 1974 - Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. (Bulletin d'Inform. I.S.T.P.M., V. 240, 7-30).

PERKINS F.O. and WOLF P.H., 1976 - Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp.n. Haplosporidan pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol. 62*, (4), 528-538.

ROUGHLEY T.C.,1926 - An investigation of the cause of an oyster mortality on the Georges River, New South Wales, 1924/1925. *Proc. Linn. Soc., 51*, (4), 446-491.

SPARKS A,K.,1963 - Infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) from Hawaii with a larval tapeworm, *Tylocephalum. J. Insect Path., 5*, (3) 284-288.

WOLF P.H.,1969 - Neoplastic growth in two Sydney rock oysters *Crassostrea commercialis* (Iredale and Roughley) *Nat. Cancer Inst. Monogr. 31*, 563-573.

WOLF P.H.,1971 - Unusually large tumor in a Sydney rock oyster. *J. Nat. Cancer Inst. 46*, 1079-1084.

WOLF P.H., 1972 - Occurrence of a Haplosporidan in Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis)* from Moreton Bay, Queensland, Australia. *J. Invert. Path., 19*, 3, 416-417.

WOLF P.H., 1976a - Occurrence of larval stages of *Tylocephalum* (Cestoda : Lecanicphaloidea) in two oyster species from Northern Australia. *J. Invert. Path., 27*, 129-131.

WOLF P.H. 1976b - Studies on the geographical distribution, etiology, and transmission of integumentary epitheliomas in rock oysters from australian estuaries. *Prog. exp. Tumor. Res., 20*, 295-303.

WOLF P.H., 1977 - An unidentifield protistan parasite in the ova of the Blacklipper Oyster, *Crassostrea echinata*, from Northern Australia. *J. Invert. Path., 29*, 244-246.

WOLF P.H. and SPRAGUE V., 1977 - An unidentified protistan parasite of the Pearl Oyster, *Pinctada maxima* in tropical Australia. *J. Invert. Path. in press.*

Acknowledgements

I am grateful to Dr. D.D. Francois, Director of the New South Wales state Fisheries, for his interest and encouragement ; Inspectors J. Irvine, T. Blackman, and Biologist R. Griffin for collecting the material, and Mrs. L. Staessens, for preparing the histological sections.

LEGEND

PLATE I

Fig. 1 - *Marteilia sydneyi.* from live smear, interference contrast. X 1000.

Fig. 2 - *Tylocephalum* in the connective tissue between the digestive diverticulae of *C. commercialis.* X 400.

Fig. 3 - Unidentified microparasite in the Pearl oyster *Pinctada maxima* from tropical Australia. Grocott's fungus stain. (X 1000, Interference contrast).

Fig. 4 - Unidentified protistan parasite in the ova of *Crassostrea echinata* from tropical Australia. X 400.

PLATE II

Fig. 5 - Neoplasm, arising from the mantle-lobe of *C. commercialis.* X 40.

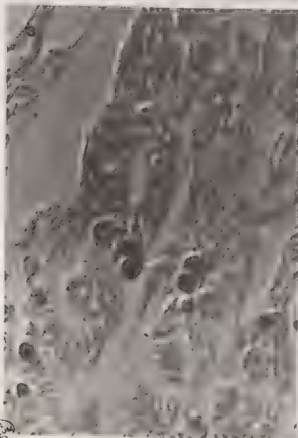
Fig. 6 - Haematopoietic neoplasm in *C. commercialis.* Dark areas show proliferation of blood cells. X 40.

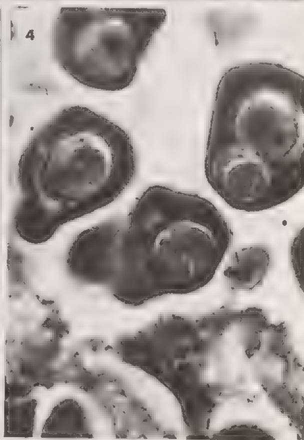
Fig. 7 - Haematopoietic neoplasm in *C. commercialis.* Atypical pycnotic blood cells with mitotic figures. X 1000.

I

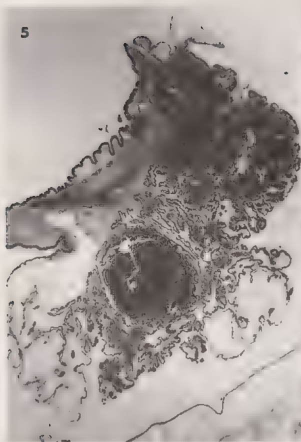




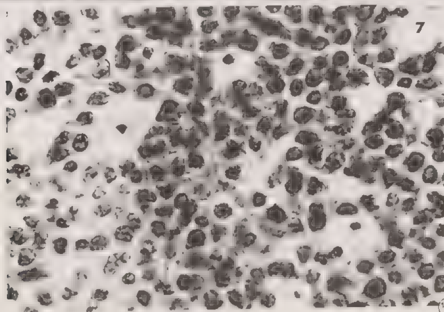




II









Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 85 à 95

LES LARVES DE TREMATODES PARASITES DES *HYDROBIA* (MOLLUSQUES PROSOBRANCHES) DES COTES DE FRANCE : NOMENCLATURE DES ESPECES

par Stéphane Deblock (*)

RESUME

De 1973 à 1977, l'auteur autopsie 18 000 mollusques Prosobranches du genre *Hydrobia* Hartman, prélevés au niveau de divers gîtes des trois façades maritimes de la France (Manche, Atlantique, Méditerranée), et constitués des espèces *H. ulvae*, *H. acuta* et *H. ventrosa*, Près de 10 % de ces hôtes hébergent des larves de trématodes, se répartissant en 39 espèces différentes, dont 19 identifiables à des parasites connus à l'état adulte. Ces derniers se distribuent dans les familles des *Hemiuridae* (1 espèce), *Psilostomatidae* (1), *Acanthocolpidae* (1), *Haploporidae* (2), *Haplosplanchnidae* (1), *Echinostomatidae* (2), *Microphallidae* (9), *Cryptogonimidae* (1) et *Acanthostomatidae* (1).

THE LARVAL TREMATODES INFECTING THE *HYDROBIA* (PROSOBRANCH MOLLUSCS) FROM THE FRENCH COASTS : A LIST OF SPECIES

SUMMARY

From 1973 to 1977, the author examines 18 000 Prosobranch Molluscs of the genus *Hydrobia* Hartman, collected in several places of the three maritime coasts of France (the Channel, Atlantic Ocean and Mediterranean Sea). The populations of molluscs are constituted of three species : *H. ulvae*, *H. acuta* and *H. ventrosa*. Almost ten per cent of the amount are parasited by trematodes larvae, distributed in 39 different species. Nineteen can be identified with parasites known at the adult stage ; these one are distributed in the following families : *Hemiuridae* (1 species), *Psilostomatidae* (1), *Acanthocolpidae* (1), *Haploporidae* (2), *Haplosplanchnidae* (1), *Echinostomatidae* (2), *Microphallidae* (9), *Cryptogonimidae* (1) and *Acanthostomatidae* (1). The 39 species are briefly described.

Les larves des trématodes parasites des mollusques du genre *Hydrobia* Hartman des côtes de France n'ont encore jamais fait l'objet d'investigation systématique. Néanmoins cette faune est déjà partiellement connue d'après les travaux de Rebecq (1964) en Camargue, Sellin (1970) en Bretagne, Farès et Maillard (1974) puis Maillard (1976) dans les étangs littoraux du Languedoc, et de quelques autres auteurs encore décrivant des cycles évolutifs de trématodes ayant ces mollusques comme hôte intermédiaire. En Europe, cette faune est explorée par Lebour (1907 - 1908), Rothschild (1935 à 1941), Markowsky (1936), Reimer (1963 à 1970), Loos-Frank (1967-1968) etc... auteurs ayant travaillé soit en Grande-Bretagne, soit dans les pays riverains de la Mer du Nord et de la Baltique.

(*) Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, rue Laguesse,
59045 Lille, France.

Pour mener à bien l'inventaire des parasites propres aux *Hydrobia* des côtes de France, les prélèvements eurent lieu : 1) dans les estuaires des rivières côtières de la Manche, telles que la Slack, la Canche, l'Authie, la Somme, la Vire ; 2) sur les vasières de l'ile d'Oléron, de la baie d'Arcachon et du lac d'Hossegor sur les côtes de l'Atlantique ; 3) dans l'étang de l'Arnel sur la Méditerranée. Certains gites furent prospectés à plusieurs reprises, de 1973 à 1977.

La quasi totalité des mollusques récoltés sur les côtes océaniques appartient à l'espèce *Hydrobia ulvae* (Pennant) ; *H. ventrosa* (Montagu) y est apparue toujours comme très exceptionnelle. Le gite méditerranéen de l'Arnel abrite surtout *H. acuta* (Draparnaud), auquel se mêle une population moins abondante de *H. ventrosa*. L'autopsie de 18 000 mollusques a révélé environ 1 700 individus parasités par des larves de trématodes appartenant à 39 espèces différentes au moins. Le parasitisme varie notablement en fonction de la situation géographique des gites, et au sein d'un gite donné, en fonction des années et des saisons.

Les espèces répertoriées sont classées ci-après selon la morphologie des cercaires.

1) Cercaires à queue fourchue (Furcocercaires). *SCHISTOSOMATIDAE*

Furcocercaire de Schistosomatidé s.p. N°1 - Corps : 250 x 80 (1). Tégument spinulé. Queue : 260-360. Fourchons courts (130), bordés d'un double voile étroit. Bistome, apharyngée. 2 (2+2) = 8 glandes. 2 (2+1) +2 (+1 caudal) = 12 solénocytes. Pore excréteur ouvert à l'extrêmité des fourchons. Naissance dans sporocystes allongés.

Hydrobia acuta. Méditerranée.

2) Cercaires à kyste caudal (Cercaires cystophores). *HEMIURIDAE*

Cercaires bistomes au corps immature, à tégument lisse, pourvues d'une chambre caudale lenticulaire munie d'appendices divers filamenteux ou non. Vesicule excrétrice en Y. Naissance dans rédie allongée.

Cercaria sinitzini Rothschild, 1938 - Corps : 60-70. Chambre caudale : 50-60x30-45. Filament caudal : 125-150. Tube éjecteur : 70. Panache : 50-65. Bonnet phrygien : 20-35. Filament annexe : 40-60.

Hydrobia ulvae. Atlantique.

Cercaria bunocotyle progenetica (Markowsky, 1936). Corps : 80-110. Chambre caudale : 45-50 x 35-40. Filament caudal : 300-500. Tube éjecteur : 100-120. Autres appendices absents. Adulte fertile dans la rédie (phénomène de progénèse). (in Deblock, 1974).

Hydrobia ulvae. Manche, Atlantique.

(1) Les nombres, à l'exception de ceux exprimant des formules glandulaires ou des formules excrétrices, correspondent à des dimensions moyennes exprimées en micromètres (µm).

Cercaire cystophore N° 3. Corps 80-90. Chambre caudale : 53-58 x 45-48. Filament caudal : 110-130 entouré d'une gaine hélicoïdale. Tube éjecteur : 100-130. Panache : 30-40 Bonnet phrygien : 15.

Hydrobia acuta. Méditerranée.

3) Cervaires gymnocéphales leptocerques.

A) Cercaires bistomes inermes.

a) PSILOSTOMATIDAE

Cercaria Psilostomum brevicolle (Creplin, 1829). Corps : 370. Tégument lisse, Queue : 250. Acétabulum occlus par des bandes musculeuses transverses. Coecums longs. Vessie annulaire à extension pré-pharygienne. Solénocytes abondants. 2 pores excréteurs ouverts à mi-queue. Moitié distale de la queue garnie d'une petit velum dorso-ventral. Naissance dans rédies fusiformes pourvues d'appendices caudaux.

Métacercaire dans mollusques Lamellibranches (*Cardium, Mytilus*). Adultes chez Oiseaux. (in Loos-Frank, 1967).

Hydrobia ulvae. Atlantique.

b) ACANTHOCOLPIDAE

Cercaria Deropristis inflata (Molin, 1858). Corps : 230. Tégument finement épineux. Queue : 300-340. Coecums longs. Corps opacifié par de nombreuses granulations circulaires réfringentes. Vessie sacculaire ovoïde courte. Nombreux solénocytes (60). Six paires de papilles pilifères latérales caudales. Un petit velum caudal court et moyen. Naissance dans rédie cylindrique.

Métacercaire chez Annélides (*Nereis*). Adulte chez poissons (*Anguilla*) (in Maillard, 1976).

Hydrobia ulvae, H. acuta. Manche, Atlantique, Méditerranée.

c) HAPLOPORIDAE

Cercaires bistomes ocellées brunes à tégument lisse et épais, à tube digestif caractéristique et système osmo-régulateur sténostome. Poche hermaphrodite présente. Naissance dans rédie courte. Maturation extra-rédiale et enkystement rapide dans le milieu extérieur après émission. Adulte parasite de Poissons.

Cercaria Saccocaelium tensum Looss, 1902. Corps : 230 x 120. Queue : 270-330. Tégument "perlé". Pharynx : 25 x 29. Vessie en Y à branches paires longues (acétabulaires). 2x14 solénocytes. Kyste ovalaire étiré (150) à enveloppe mucoïde largement réticulés.

Adulte chez Poissons (*Mugil*). (in Farès et Maillard, 1974).

Hydrobia acuta, H.ventrosa. Mediterranée.

Cercaria Haploporus benedeni (Stossich, 1887). Corps : 350. Queue : 380. Pharynx : 50x60. Vessie sacculaire courte post-caecale. Canaux osmorégulateurs droits et gauches anastomosés à leur origine et confluant simultanément au sommet de la vessie. 2x30

solénocytes. Kyste ovoïde étiré (270x100) à enveloppe mucoïde très irrégulièrement distribuée.

Adulte chez Poissons (*Mugil*). (in Farès et Maillard, 1974).

Hydrobia acuta, *H. ventrosa*. Méditerranée.

Cercaire d'Haploporidé sp. N° 3 (= ? *Haploporus sp.*). Corps : 200-260. Queue : 270-400. Pharynx 25x23. Vessie sacculaire courte post-coecale. Canaux osmo-régulateurs comme dans l'espèce précédente. 2x24 solénocytes. Kyste ovoïde étiré (210x80) doublé d'une enveloppe mucoïde hyaline aplatie en palette large au pôle le plus étroit du kyste.

Hydrobia ulvae. Manche, Atlantique.

Cercaire d'Haploporidé sp. N°4 . Corps : 370-420. Queue : 600-650. Pharynx : 60x50. Tube digestif long. Vessie en Y à branches longues franchissant les caecums. Kyste subsphérique de 240 x 210 à enveloppe mucoïde ténue sans différenciation marquée de structure.

Hydrobia ulvae. Atlantique.

Cercaire d'Haploporidé sp. N° 5. Corps : 170-210. Queue : 200-300. Ventouses volumineuses. Pharynx : 30 x 20. Tube digestif court. Vessie en Y à branches courtes post-caecales. 2 x 14 = 28 solénocytes. Kyste ovalaire de 130-160 à enveloppe mucoïde finement réticulée pourvue de tortillons polaires.

Hydrobia ulvae. Manche, Atlantique.

Cercaire d'Haploporidé sp. N° 6. Corps : 250-350. Queue : 360-400. Pharynx 40x40. Tube digestif long. Vessie en Y à branches franchissant les caecums. 2 x 16 = 32 solénocytes. Kyste ovoïde de 130-140 à enveloppe mucoïde finement réticulée formant pédoncule polaire unique.

Hydrobia ulvae. Manche, Atlantique.

d) HAPLOSPLANCHNIDAE

Cercaria Haplosplanchnus pachysomus (Eysenhardt, 1829). Corps : 245. Queue : 250, ornementée de neuf paires d'expansions latérales épineuses formant échelle de perroquet. Caecum absent, remplacé par une poche oesophagienne. Vessie en V à branches courtes. 2x7 = 14 solénocytes. Kyste ovoïde allongé (220x65) prolongé à son pôle étroit d'une palette mucoïde recourbée en crochet.

Adulte chez Poissons (*Mugil*). (in Farès et Maillard, 1975).

Hydrobia ventrosa. Méditerranée.

B) Cercaires bistomes et à collier armé d'Echinostomes.

ECHINOSTOMATIDAE

Cercaires à tégument épineux portant un collier scapulaire réniforme de longues épines à l'image de celui des adultes. Caecums longs. Système excréteur sténostome à nombreux

solénocytes. Pores excréteurs caudaux. Naissance dans rédies cylindriques longues.

Cercaria Himasthla continua Loos-Frank, 1967 - Corps de 400-520 (moyenne : 450-500). Queue : 310-360. Collier de 29 épines. 126 solénocytes (dont 2x9 - 10 solénocytes céphaliques). 2 pores excréteurs situés au 1/4 caudal antérieur.

Métacercaires enkystées dans Mollusques Lamellibranches (*Cardium, Mytilus, Macoma..*) Adulte chez Oiseaux (Lariformes : *Larus*).

Hydrobia ulvae. Manche.

Cercaria Himasthla interrupta Loos-Frank, 1967. Corps : 350-400. Queue : 250-290. Collier de 29 épines. 66 solénocytes (dont 2x4-5 solénocytes céphaliques). 2 pores excréteurs au 1/4 caudal antérieur.

Métacercaire enkystée chez Mollusques Lamellibranches (*Cardium, Mytilus, Macoma...*). Adultes chez Oiseaux (Lariformes : *Larus*).

Hydrobia ulvae. Manche, Atlantique.

Cercaire d'Echinostome sp. N°3. Corps : 280-360. Queue : 350. Collier de 29 épines 66 (?) solénocytes (dont 2x4 - 5 céphaliques). 2 pores excréteurs à mi-longueur de la queue.

Hydrobia ulvae. Manche.

Cercaire d'Echinostome sp. N° 4. Corps : 470. Queue : 330. Collier de 29 épines. 126 (?) solénocytes (dont 2x8 - 9 céphaliques). 2 pores excréteurs au 1/4 caudal antérieur.

Métacercaire enkystée dans le mollusque hôte. Kyste lenticulaire de 210x190.

Hydrobia ulvae. Atlantique.

C) Cercaires leptocerques monostomes.

1 - Cercaires ocellées de *NOTOCOTYLIDAE*

Cercaires opaques fortement pigmentées, à tégument lisse, apharyngées et à coecums longs. 2 ou 3 taches oculaires. Deux organes adhésifs postérieurs. Un canal excréteur annulaire ; 24 ou 36 solénocytes. Pores excréteurs caudaux. Naissance dans rédies. Maturation extra-rédiale et enkystement spontané dans le milieu extérieur après émission.

Cercaire de Notocotylidé sp. N° 1. Corps : 250-350. Queue : 260-460. Trioculée à l'état mûr. Canal excréteur du type yenchigensis diversement diverticulé au voisinage des yeux. Les cercaires immatures présentent 2 (6+4) = 20 taches claires longitudinales. 2 (3x3) + (3x3) = 36 solénocytes. Kyste de la métacercaire : 160-180.

Hydrobia ulvae. Manche. Atlantique.

N.B. Les cercaires du type ci-dessus forment probablement un complexe d'espèces que leur pauvreté morphologique ne permet pas de différencier avec certitude. (in Rothschild, 1941).

2 - Cercaires ocellées anentériques

Cercaires ocellée anentérique et inerme sp. N°1, - Corps foliacé clair 180. Queue : 200. Téguments inermes. 2x7 glandes de pénétration, agencés à leur terminaison pré-orale selon la formule 2 (3 + 4) = 14. Vessie en V à paroi épaisse. Canaux excréteurs mésostomes. 2 (3x2) + (3x2) = 24 solénocytes. I glande post-vésicale en ailes de papillon. Naissance dans rédie sans caecum. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae, H. acuta, Manche, Méditerranée.

3 - Cercaires non ocellées anentériques et armées (Xiphidiocercaires).
MICROPHALLIDAE.

Ventouse orale munie d'un stylet. Tégument lisses. 4 paires de glandes. Vessie en V à branches courtes et paroi mince. Canaux excréteurs mésostomes. 2 (2+2) = 16 solénocytes. Naissance dans sporocystes. L'existence de "cercaire confinées" ne sortant pas des sporocystes d'accompagne de divers degrès de régression du type fondamental.

Cercaria Microphallus claviformis (Brandes, 1888). Corps : 90. Queue : 75-115. Stylet : 18-20 en forme de coin, de profil non caréné. 2x2 glandes de pénétration seulement. 2x2 conduits glandulaires formant réservoirs.

Métacercaire chez Crustacés Amphipodes et Isopodes. Adultes chez Oiseaux (Lariformes et Charadriiformes). (In Deblock et Rosé, 1965).

Hydrobia ulvae, Manche, Atlantique.

N.B. Cette forme de cercaire est vraisemblablement commune à plusieurs espèces de trématodes non identifiés ; l'une d'entre elle a tendance à s'enkyster spontanément *in vitro* dans un kyste ovalaire de 60-70 µ.

Cercaria Microphallus papillorobustus (Rankin, 1940). Corps : 100-170. Queue : 150. Stylet : 18-20 en forme de coin, de profil caréné. 2 x 2 = 4 glandes de pénétration. 4 conduits glandulaires formant réservoir.

Métacercaire chez Crustacés Amphipodes (*Gammarus*). Adultes chez Oiseaux (Lariformes et Charadriiformes). (in Rebecq, 1964).

Hydrobia acuta, H. ventrosa. Méditerranée.

Cercaria Maritrema subdolum Jaegerskioeld, 1909. Corps : 125. Queue : 135. Stylet : 13 - 16 en lancette pourvue d'un bulbe subterminal. 2 (2+2) = 8 glandes. Canaux inégaux groupés selon la formule 2 (3+1), les canaux internes se chevauchent en arrière de la ventouse.

Métacercaires chez Crustacés (Isopodes, Amphipodes et Décapodes). Adultes chez Oiseaux (Lariformes et Charadriiformes). (in Deblock et coll., 1961).

Hydrobia ulvae, H. acuta, Manche, Atlantique, Méditerranée.

Cercaire de Microphallidé (?) sp. n° 4. Corps : 120-150. Queue : 110-140. Stylet : 23-24 en forme d'aiguille à bulbe sub-médian et de profil caréné. 2 (2 + 2) = 8 glandes. Canaux groupés comme précédemment, mais pas de chevauchement. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae, Manche, Atlantique.

Cercaire de Microphallidé (?) sp. N° 5. Corps : 100. Stylet : 27, en forme d'aiguille sans bulbe. 8 glandes comme l'espèce précédente.

Hydrobia ulvae. Atlantique.

N.B. Présence (accidentelle ?) d'une unique métacercaire libre immature dans un des sporocyste à aspect de Microphallide évoquant le genre *Odhneria* Travassos, 1921.

- Groupe des cercaires confinées -

Cercaria Maritrema oocysta (Lebour, 1907). Aspect général semi-embryonnaire. Corps 50-70. Queue : 50-80. Stylet en lancette à bulbe sub-médian : 7-11. 2 glandes vestigiales. 8 conduits glandulaires ténus persistants. Métacercaire enkystée dans le sporocyste ; kyste ovalaire : 125-145 x 70-85. Larve : 200-290. (in Deblock, 1975). Adulte chez Oiseaux (Charadriiforme : *Tringa).*

Hydrobia ulvae, Manche.

Cercaria microphallus somateriae (Kulatschkowa, 1958). Aspect général semi embryonnaire. Corps : 95. Queue : 85-110. Stylet en forme de coin : 16. 2 glandes vestigiales. Conduits formant réservoir. Métacercaire enkystée dans le sporocyste ; kyste sphérique : 85-115. Larve : 180-210. Adultes chez Oiseaux (Ansériformes).

Hydrobia ulvae, H. acuta, Manche, Atlantique, Méditerranée.

Cercaria Microphallus breviatus Deblock et Maillard, 1975. Aspect général semi embryonnaire. Corps : 80-100. Queue : 100. Stylet : 9-11. 2 x 2 = 4 glandes et 4 conduits persistants. 2 (1 + 1) = 4 solénocytes. Métacercaire enkystée dans le sporocyste. Kyste subsphérique : 130-140 x 115-120. Larve : 200-300. Hôte définitif inconnu.

Hydrobia ventrosa, Méditerranée.

Cercaria Maritrema syntomocyclus Deblock et Ky, 1966. Pseudo-cercariaeum d'aspect semi-embryonnaire. Corps 70-90. Queue absente. Stylet absent. 2 (2+2) - 8 glandes. 16 solénocytes. Métacercaire enkystée dans le sporocyste ; kyste sphérique : 135. Larve : 190-270. Hôte définitif inconnu.
mémoire).

Hydrobia acuta. Méditerranée, (Corse) (citée pour mémoire).

Cercaria Microphallus abortivus Deblock, 1974. Cercaire réduite à l'état de bourgeon (blastocercaire). Corps : 70-80. Queue absente. Stylet absent. Glandes absentes. Solénocytes exceptionnels. Métacercaire enkystée dans le sporocyste. Kyste subsphérique : 125-135. Larve : 150-240, à épines tégumentaires "fortes". Hôte définitif inconnu.

Hydrobia ulvae. Atlantique.

Cercaria Microphallus scolectroma Deblock et Ky, 1966. Cercaire réduite à l'état de bourgeon (blastocercaire). Corps : 70-100. Ni queue, ni stylet ni glande ni solénocytes. Métacercaire enkystée dans le sporocyste. Kyste sphérique : 110-125. Métacercaire : 300-340. Hôte définitif inconnu.

Hydrobia acuta. Méditerranée, (Corse). (Citée pour Mémoire).

Cercaria ? Levinseniella sp. N°1 (cf Deblock, 1974). Blastocercaire sans queue ni stylet ni glande ni solénocyte. Corps : 70-80. Métacercaire enkystée dans le sporocyste. Kyste : 85-105 subsphérique. Larve demeurant partiellement immature : 200. Hôte définitif inconnu.

Hydrobia ulvae. Atlantique, Manche.

D) Xiphidiocercaires microcerques.

Xiphidiocercaire microcerque sp. N°1. Corps : 170-200. Téguments lisses. Queue : 16-18. Stylet/ 19-21 en forme de coin. Reste de l'anatomie comme celle des Xiphidiocercaires leptocerques du groupe précédent. Naissance dans sporocyste. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae. Atlantique, Manche.

Xiphidiocercaire microcerque sp. N°2 (= *Cercaria camarguensis* Rebecq, 1964).

Morphologie identique à la précédente. Stylet : 29-32. Biologie inconnue.

Hydrobia acuta. Méditerranée.

Cercaires pleurolophocerques.

Cercaires ocellées monostomes leptocerques caractérisées par la présence de larges membranes fines implantées selon les méridiens dorso-ventraux ou latéraux de la queue. Corps incolore à ventouse orale modifiée en un organe protractile de pénétration. Système excréteur mésostome. Vessie en V à branches courtes et parois épaisses. Pas de tube digestif sauf le pharynx. Naissance dans rédie de petite taille.

CRYPTOGONIMIDAE

Cercaria Aphalloides coelomicola Dollfus, Chabaud et Golvan, 1957. Corps : 200. Queue : 350 à voile circum-caudal dorso-ventral asymétrique. 2 x 10 - 11 glandes de

pénétration. 2 (2+2) + (2+2) = 16 solénocytes. Primordium genital formé de 6 cellules granuleuses en disque régulier chez la cercaire immature. Queue enroulée en cross du côté dorsal chez le cercaire au repos.

Métacercaire enkystée dans muscles du Gobie (*Pomatoschistus*). Adulte chez le même hôte. (in Maillard, 1976).

Hydrobia ventrosa. Méditerranée.

ACANTHOSTOMATIDAE

Cercaria Timoniella praeteritum (Looss, 1901). Corps : 160-180. Queue : 320, à voile identique au précédent. 2 x 10 glandes. Canaux excréteurs terminaux agencés selon la formule 2 (4+6). 2 (2+2) + (2+2) = 16 solénocytes. Primordium génital comme le précédent. Queue droite au repos. Métacercaire enkystée dans muscles de divers poissons. Adulte chez les Poissons (*Dicentrarchus labrax* ou loup) (in Maillard, 1976).

Hydrobia ulvae, H. acuta. Manche, Atlantique, Méditerranée.

Cercaire pleurolophocerque sp. N°3. Corps : 160-170. Queue : 330-360, à voile comme les précédents. 2 x 7 glandes. Canaux excréteurs terminaux agencés selon la formule : 2 (3+4) et partiellement confondus en avant du pharynx. 2 (2+2+2) + (2+2+2) = 24 solénocytes. Primordium génital non en disque chez les cercaires immatures. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae, H. acuta. Manche, Atlantique, Méditerranée.

Cercaire pleurolophocerque sp. N°4. Corps : 130-160. Queue : 290-330 à voile comme les précédants doublé de deux voiles latéraux plissés et symétriques sous-tendus par une paire de bâtonnets chacuns. 2 x 10 glandes. 2 x 14 = 28 solénocytes. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae, Manche. Atlantique.

Métacercaires libres de *GYMNOPHALLIDAE*

Cercariaeum préfigurant le trématode adulte. Tégument épineux. Ventouses inégales. Tube digestif et caeca courts. Glandes céphaliques présentes. Vessie en V à branches très longues. Gonades présentes latéralement en arrière de l'acétabulum.

Cercariaeum de *Gymnophallus* sp. N°1 (= *Parvatrema* sp. 2 *sensu* Rebecq, 1964). Corps 440 x 225. 2 (3 x 2) + (3x 2) = 24 solénocytes. Biologie inconnue.

Hydrobia ventrosa, Méditerranée.

Cercariaeum de *Gymnophallus* sp. N°2 (= *Cercaria glandosa* Lebour, 1908). Corps 160 - 200. Glandes céphaliques très développées s'étendant parfois jusqu'au niveau de l'acétabulum. Biologie inconnue.

Hydrobia ulvae. Manche.

REFERENCES

DEBLOCK S., 1974 - Présence en France de *Bunocotyle progenetica* (Markowsky, 1936) Trématode digène. *Bull. Soc. Zool. France, 99*, 593-600.

DEBLOCK S., 1974 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*). XXVIII. *Microphallus abortivus* n. sp., espèce à cycle évolutif abrégé originaire d'Oléron. *Ann. Par. Hum. et Comp., 49*, 175-184.

DEBLOCK S., 1975 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*). XXXI. De la condensation des cycles évolutifs chez les Microphallidés, à propos de *Maritrema oocysta* (Lebour, 1907). *Ann. Par. Hum. et Comp., 50*, 579-589.

DEBLOCK S., CAPRON A. et ROSE F., 1961 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*). V. - Le Genre *Maritrema* Nicoll, 1907. Cycle évolutif de *Maritrema subdolum* Jaegerskioeld, 1909. *Parassitologia, 3*, 105-119.

DEBLOCK S. et KY T.V., 1966 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*) des côtes de France. XIII. Description de deux espèces nouvelles à cycle évolutif abrégé, originaire de Corse. *Ann. Par. Hum. et Comp., 41*, 313-335.

DEBLOCK S. et MAILLARD C., 1975 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*). XXXII. *Microphallus breviatus* n. sp., espèce à cycle évolutif abrégé originaire d'un étang méditerranéen du Languedoc. *Acta tropica, 32*, 317-326.

DEBLOCK S. et ROSE F., 1965 - Contribution à l'étude des *Microphallidae* Travassos, 1920 (*Trematoda*) des oiseaux de France. XI. Identification de la cercaire de *Microphallus claviformis* (Brandes, 1888). *Bull. Soc. Zool. France, 90*, 299-314.

FARES A. et MAILLARD C., 1974 - Recherches sur quelques *Haploporidae (Trematoda)* parasites des Muges de Méditerranée occidentale. Systématique et cycles évolutifs. *Zeitsch. f. Parasitenk., 45*, 11-43.

FARES A. et MAILLARD C., 1975 - Cycle évolutif de *Haplosplanchnus pachysomus* (Eysenhardt, 1829) Looss, 1902 (*Trematoda Haplosplanchnidae*) parasite de Mugilidés (*Teleostei*). *Bull. Mus. Nation. Hist. Nat. Paris*, 3ème sér., Zool *219*, N° 312, 837-844.

LEBOUR M.V., 1907 - Larval trematodes of the Northumberland coast. *Trans. Nat. Hist. Soc. Northumb.*, New ser., *1*, 437-454 et 500-501.

LEBOUR M.V., 1908 - Trematodes of the Northumberland coast, N° 11. *Trans. Nat. Hist. Soc. Northumb., 3*, 28-45.

LOOS-FRANK B., 1967 - Experimentelle Untersuchungen über Ban, Entwicklung und Systematik der *Himasthlinae (Trematoda Echinostomatidae)* des Nordseeraumes. *Zeitschr. f. Parasitenk., 28,* 299-351.

LOOS-FRANK B., 1968 - Der Entwicklungszyclus von *Psilostomum brevicolle* (Creplin, 1829) (syn. *P. platyurum* Mühling, 1896) *Trematoda Psilostomatidae. Zeitschr. f. Parasitenk., 31,* 122-131.

MAILLARD C., 1976 - *Distomatose de Poissons en milieu lagunaire.* Thèse Fac. Sciences, Montpellier, 383 pp.

MARKOWSKY S., 1936 - Ueber die Trematodenfauna der baltischen Mollusken aus der Umgebund der Halbinsel Hel. *Bull. Acad. Polon. Sc. et Lettres, II ;* 285-317 et pl. XIII-XV.

REBECQ J., 1964 - Recherches systématiques, biologique et écologiques sur les formes larvaires de quelques trématodes de Camargue. Thèse Fac. Sciences, Aix-Marseille, 223 pp.

REIMER L.W., 1963 - Zur Verbreitung der Adulti und Larvenstadien der Familie *Microphallidae* Viana, 1924 *(Trematoda, Digenea)* in der Mittleren Ostsee. *Zeitschr. f. Parasitenk., 23,* 253-273.

REIMER L.W., 1970 - Digene Trematoden und Cestoden der Ostseefische als natürliche Fischmarken. *Parasitolog. Schrift., 20,* 144 pp.

ROTHSCHILD M., 1936 - Preliminary note on the trematode parasites of *Peringia ulvae* (Pennant, 1777). *Novitates Zool. 39,* 268-269.

ROTHSCHILD M., 1938 - *Cercaria sinitzini* n. sp. a cystophorus cercaria from *Peringia ulvae* (Pennant, 1777). *Novitates Zool., 41,* 42-57.

ROTHSCHILD M., 1941 - Note on life histories of the genus *Paramonostomum* Lühe, 1909 *(Trematoda : Notocotylidae)* with special reference to the excretory vesicle. *Jl. Parasitol., 27,* 363-365.

SELLIN B., 1970 - Contribution à l'étude de quelques trématodes de la côte nord de la Bretagne. Thèse Fac. Sciences, Rennes, 85 pp.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 97 à 98

THE RELATED BIOLOGIES OF THE MONOGENEAN PARASITE *ISANCISTRUM* AND ITS CEPHALOPOD HOST *ALLOTEUTHIS SUBULATA*

by Jack Llewellyn(*)

SUMMARY

A species of the viviparous gyrodactylid monogenean *Isancistrum* infectects the arms of the squid *Alloteuthis subulata* at Plymouth. In heavy infections there may be up to 5000 or so parasites per host, and new hosts are invaded by direct transfer of the parasite during mating.

BIOLOGIE DES RELATIONS ENTRE LE PARASITE MONOGENE *ISANCISTRUM* ET SON HOTE CEPHALOPODE *ALLOTEUTHIS SUBULATA*

RESUME

Une espèce de gyrodactylide monogène vivipare *Isancistrum* parasite les bras du cephalopode *Alloteuthis subulata* à Playmouth. Dans les infections sévères, il y a jusqu'à 5.000 parasites par hôte et les hôtes nouveaux sont envahis par le transfert direct du parasite au cours de la copulation.

Following the re-discovery of the gyrocotyloidean *Isancistrum loliginis* de Beauchamp, 1912 on the squid *Alloteuthis subulata* at Plymouth, and of the finding of a second species of the same genus of the parasite on the arms and tentacles of the same host studies have been made of the method of transfer of the parasites to new hosts.

It has been shown that new hosts are invaded by direct transfer when the hosts mate. Populations of more than 5000 isancistrines per squid have been found on the arms and tentacles of *Alloteuthis*, and if such an infection be found to be pathogenic, then since the transfer is by contagion during copulation of the hosts, the occurence of *Isancistrum* on *Alloteuthis* would constitute a veneral disease of this squid.

(*) Department of Zoology and Comparative Physiology, The University, P.O. Box 363, Birmingham B15 2TT, England.

REFERENCES

DE BEAUCHAMP P., 1912 - *Bull. Soc. Zool. Fr.*, *37*, 96-99.

LLEWELLYN J., 1974 - *Proc. Third Int. Congr. Parasitol.*, *1*, 728-729.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 99 à 102

MYTILICOLIDES ET MYICOLIDES PARASITES DES LAMELLIBRANCHES D'INTERET COMMERCIAL DU BASSIN D'ARCACHON

par Edouard His (*)

RESUME

Après la description de *Mytilicola orientalis* Mori (1935) chez *Crassostrea gigas* Thunberg du bassin d'Arcachon, un inventaire des copepodes parasites de mollusques d'importance économique a été entrepris dans la baie et dans l'estuaire de la Gironde, d'Hossegor, de l'Adour et de la Bidassoa. Nous avons étudié l'infestation par *Mytilicola orientalis*, *M. intestinalis* Steuer et *Myicola ostreae* Hoshina et Sugiura (1953).

MYTILICOLIDAE AND *MYICOLIDAE* PARASITES OF COMMERCIALLY IMPORTANT LAMELLIBRANCHS FROM BASSIN D'ARCACHON

SUMMARY

After the record of *Mytilicola orientalis* Mori (1935) in *Crassostrea gigas* Thunberg from Bassin d'Arcachon, a survey about parasitic copepods of commercially important mollusks was undertaken in the bay, but also in the estuary of Gironde, Hossegor, Adour and Bidassoa. we studied infestation by *Mytilicola orientalis*, *M. intestinalis* Steuer and *Myicola ostrea* Hoshina and Sugiura (1953).

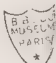
INTRODUCTION

Le copépode parasite *Mytilicola orientalis* Mori (1935) a été découvert chez *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon en mars 1977 (His, 1977). L'espèce voisine, *M. intestinalis* Steuer existe à l'état endémique chez les moules de la baie.

A la suite de la mise en évidence par Comps (1972) "d'un copépode fixé sur les branchies" des *Crassostrea angulata* Lamarck à Marennes-Oléron, ce même parasite a été retrouvé chez les huîtres de notre région ; il s'agit de *Myticola ostreae* Hoshina et Sugiura (1953).

La découverte de ces deux espèces nouvellement introduites nous a amenés à étudier leur répartition géographique et l'importance de l'infestation des mollusques d'intérêt commercial de notre région.

(*) I.S.T.P.M., 63 Boulevard Deganne, 33120 Arcachon (France)



MYTILICOLA ORIENTALIS Mori

a) Chez *Crassostrea gigas*

Le parasite existe aussi bien chez les sujets originaires du Japon, importés il y a deux ans sous forme de naissain, que chez les individus issus de la reproduction sur place. Au printemps de 1977, les taux d'infestation variaient de 10 % (Banc d'Arguin) à 48 % (Mattes d'Arès).

Les huîtres de tous âges sont contaminées ; ainsi le détroquage (sujets captés au cours de l'été 1976, mesurant en moyenne 24,16 mm de long) comporte 26 % d'individus parasités le 16 juin 1977.

Nous notons une augmentation des taux d'infestation au cours du mois de juillet ; pour deux populations suivies à Gorp (secteur continental de la baie) et à la Villa Algérienne (secteur océanique), 40 % et 36 % des *C. gigas* sont respectivement parasitées en avril et 44 % en juillet.

L'intensité de l'infestation est importante ; nous avons pu dénombrer 26 copépodes chez un seul sujet. En juillet, les huîtres de Grop sont plus massivement parasitées (5,5 crustacés par huître infestée) que celles de la Villa Algérienne (4 parasites en moyenne).

Mytilicola orientalis n'a pas été rencontré chez les *C. gigas* de la Gironde (rive gauche), du lac d'Hossegor, de l'Adour ou de la Bidassoa. Par contre, des huîtres captées à Arcachon et mises en élevage depuis le début de l'année sur les côtes du Morbihan (presqu'île de Quiberon) sont contaminées.

b) chez les autres bivalves d'intérêt commercial

M. orientalis a été décrit pour la première fois par Mori (1935) chez *C. gigas* et *Mytilus crassitesta* au Japon ; il a été signalé par Odlaug (1946) chez *C. gigas*, *Ostrea lurida*, *Mytilus edulis* et *Protothaca staminea* à Puget Sound, aux Etats-Unis, mais aussi chez le gastéropode *Crepidula fornicata* ; Chew et al. (1964) rapportent sa présence chez *Mytilus californianus* et chez le clam *Saxidomus giganteus* de la côte pacifique des Etats-Unis ; enfin, Bernard (1968) signale que *M. edulis* est le plus fréquemment infestée, suivie de *C. gigas* et *O. lurida* et enfin *Clinocardium nuttali*, en Colombie britannique.

Dans notre baie, en dehors de l'huître japonaise, seules *O. edulis*, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sont parasitées ; ces deux dernières abritent à la fois *M. orientalis* et *M. intestinalis*. Dans le cas de l'huître plate, les taux d'infestation sont faibles : 5 % le 17 mai et de 2 % à 6 % le 21 juillet pour des sujets âgés respectivement de deux et trois ans.

La palourde *Ruditapes decussatus*, la coque *Cerastoderma edule* et le couteau *Ensis siliqua* sont indemnes.

MYTILICOLA INTESTINALIS Steuer (1902)

Décelé en 1950 chez *M. galloprovincialis* de la Bidassoa, il existe aussi chez les moules du Bassin d'Arcachon depuis octobre 1963 (Le Dantec et al., 1964).

Dans notre baie existent encore à l'heure actuelle quelques populations éparses de *M. galloprovincialis* principalement ; il s'agit en majorité de sujets d'un an. En avril 1977, 6 % des moules abritaient *M. intestinalis* au Cap Ferret et 48 % à Grop ; dans ce dernier cas, nous notions à la fois la présence de *M. intestinalis* (45 copépodes) et de *M. orientalis* (2 femelles ovigères).

Les jeunes moules du lac d'Hossegor que nous avons examinées sont indemnes ; celles de la Bidassoa, plus âgées, présentaient un taux d'infestation de 60 % ; seul *M. intestinalis* a été rencontré.

MYICOLA OSTREAE Hoshina et Sugiura (1953)

Combs rapportait, en 1972, la présence d'un copépode fixé sur les branchies des *Crassostrea angulata* de Marennes-Oléron qui causait "des lésions branchiales souvent limitées à de petites surfaces" ; l'auteur ne pouvait rattacher le parasite à l'espèce *Pseudomyicola ostreae* Yamaguti (1936). Ce copépode est fréquent à Arcachon ; il s'agit en fait de *Myicola ostreae*, espèce décrite pour la première fois par Hoshina et Sugiura chez les *Crassostrea gigas* de la préfecture de Chiba au Japon. Il est rencontré depuis quelques années dans la cavité palléale des huîtres de notre baie.

Les taux d'infestation varient à l'heure actuelle de 4 % (Arams, le 18 mars 1977) à 40 % (chenal de Lège, le 31 juillet) ; nous notons de un à quatre copépodes par cavité palléale.

Les huîtres de l'estuaire de la Gironde sont infestées, celles du lac d'Hossegor, de l'embouchure de l'Adour et de la Bidassoa sont indemnes.

Myicola ostreae a aussi été rencontré chez les *Ostrea edulis* du Bassin d'Arcachon ; moules et autres bivalves d'intérêt commercial sont indemnes.

CONCLUSIONS

L'introduction massive de l'huître japonaise a été rendue inévitable par les mortalités survenues en 1971 sur les *C. angulata* des centres conchylicoles français. Elle se solde par la découverte de deux copépodes parasites, *Mytilicola orientalis* et *Myicola ostreae* ; Bernard (1968) rappelle que le premier a été introduit de la même façon aux Etats-Unis et en Colombie britannique à la suite de l'immersion d'huîtres en provenance du Japon.

L'espèce voisine, *M. intestinalis*, parasite des moules, existe sur notre littoral où des mortalités sévères lui sont attribuées.

Dans le Bassin d'Arcachon, les huîtres creuses présentent des taux d'infestation élevés ; la parasitose s'est développée très rapidement ; jusqu'au printemps dernier, le copépode était inconnu dans notre baie ; il a gagné l'ensemble du Bassin en quelques mois ; l'intensité de l'infestation est importante ; or, notre région fournit du naissain et des huîtres d'élevage à plusieurs centres conchylicoles français ; déjà, nous avons pu constater la présence de *M. orientalis* chez des huîtres du Morbihan qui provenaient de notre région. Il est à craindre que l'ensemble du littoral ne soit tôt ou tard gagné par la parasitose. Enfin, le copépode se rencontre aussi chez les moules et les huîtres plates.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERNARD F.R., 1968. - Incidence and effect of the copepod *Mytilicola orientalis* Mori on the Pacific oyster of British Columbia. *Fish. Res. Bd Canada, MS Rept 993*, 14 p.

CHEW K.K., SPARKS A.K. et KATKANSKY S.C., 1964. - First record of *Mytilicola orientalis* Mori in the California mussel *Mytilus californianus* Conrad. *J. Fish. Res. Bd Canada, 21* (1) : 205-207.

COMPS M., 1972. - Sur un copépode parasite de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk) dans le Bassin de Marennes-Oléron. *Cons. int. Explor. Mer, Com. Crust., Coquill. Benth., CM* 1972 : K 35.

HIS E., 1977. - Observations préliminaires sur la présence de *Mytilicola orientalis* Mori (1935) chez *Crassostrea gigas* Thunberg dans le Bassin d'Arcachon. *Bull. Soc. Géol. et amis du Muséum du Havre, 64* (2) : 7-8.

KATKANSKY S.C., SPARKS A.K. et CHEW K.K., 1967. - Distribution and effects oh the endoparasitic copepod *Mytilicola orientalis*, on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, on the Pacific coast. *Proc. natn. Shellfish. Ass., 57* : 50-58.

LE DANTEC J. et BOREL M., 1964. - Les moules du littoral atlantique au sud de la Gironde et leurs crustacés parasites (observations d'octobre 1963 à avril 1964) sur la rive gauche de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon. *Cons. intern. Explor. Mer, Com. Moll. Crust.*, n° 49.

ODIAUG R.O., 1946. - The effect of the copepod *Mytilicola orientalis* upon the Olympia oyster *Ostrea lurida*. *Trans. Am. microsc. Soc., 65* : 311-317.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 103 à 114

LES CHAMPIGNONS PARASITES DE MOLLUSQUES : POSITION SYSTEMATIQUE ET PATHOGENIE

par Jehanne-F. Manier et Georges Bouix (*)

RESUME

Les maladies à Champignons des Mollusques peuvent être groupées suivant leur localisation dans l'hôte, en maladies des oeufs et des larves (exemple, *Sirolpidium zoophtorum*), de la coquille (exemple, *Ostracoblabe implexa*), des tissus mous (exemple, *Dermocystidium marinum*). *D. marinum* et *O. implexa* sont les deux espèces les plus étudiées et cela en raison des dégâts qu'elles occasionnent dans les parcs à Huîtres. L'inventaire que nous avons pu dresser est assez pauvre ; en outre, plusieurs de ces parasites ont une position systématique incertaine qui fait hésiter à les classer soit parmi les Fungi, soit parmi les Protozoaires.

THE FUNGI PARASITES OF MOLLUSCS : TAXONOMIC POSITION AND PATHOGENICITY

SUMMARY

The fungal diseases of Molluscs can be classified according to the parasite distribution in the host into the diseases of eggs or embryos (as *Sirolpidium zoophthorum* of the shell (as *Ostracoblabe implexa*) and the soft tissues (as *Dermocystidium marinum*). *D. marinum* and *O. implexa* are the two species with have been the most thoroughly studied so far because of the damage they cause in the Oyster parks. The list of the species is rather scant and further more the taxonomic position of several of those parasites is still incertain, consequently it is difficult to class them either as Fungi or Protozoa.

INTRODUCTION

Les Champignons parasites de Mollusques actuellement identifiés sont peu nombreux. Ils appartiennent à différentes classes : Fungi Imperfecti, Phycomycètes, Labyrinthulales, Ascomycètes. Parmi eux, plusieurs ont une position systématique encore douteuse et, sous réserve d'un changement ultérieur, sont momentanément incorpores aux Fungi.

Certains de ces parasites ont un intérêt considérable, en raison de leurs caractères intrinseques mais surtout de leur importante économique :

- reelle : c'est le cas des pathogènes des Huîtres (*Dermocystidium marinum*, agent de la "gaping disease" ; *Ostracoblabe implexa*, agent de la "maladie du pied") ;

(*) Laboratoire d'Ichthyologie et de Parasitologie Générale, Université des Sciences et Techniques du Lanquedoc, Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier (France)

- potentielle : c'est le cas des destructeurs de ponte (*Sirolpidium zoophthorum, Haliphthoros milfordensis*).

Les hôtes sont principalement des Lamellibranches (surtout des Huîtres : *Crassostrea angulata, C. gigas* et *Ostrea edulis*), mais aussi quelques Gastéropodes (comme *Urosalpinx cinerea* et *Agriolimax agrestis*). Enfin, à l'exception de rares Gastéropodes terrestres (exemple, *Agriolimax agrestis*), tous les hôtes signalés sont marins.

Nous avons choisi de présenter ces parasites en tenant compte de leur localisation dans l'hôte : champignons des pontes et des larves, champignons de la coquille, champignons des divers tissus mous.

LES CHAMPIGNONS PARASITES DES PONTES ET DES LARVES

Trois espèces ont été décrites et nommées (*) :

Sirolpidium zoophthorum Vishniac, 1955

S. zoophthorum est une Lagénidiale parasite des larves de diverses *Venus* et *Crassostrea*, signalée par Davis et al. (1954), puis nommée par Vishniac (1955). Au cours du cycle, la germination de cystospores donne naissance à un enchevêtrement d'hyphes de 7 à 10 µm de large. Les cellules terminales se renflent en sporanges de 80 µm de diamètre. Les zoospores biflagellées s'échappent de ces sporanges par un long tube. Ces mêmes thalles peuvent se désarticuler en germes et en cellules résistantes.

Sirolpidium zoophthorum est responsable d'un taux élevé de mortalité dans les bassins d'élevage de certains Bivalves (Alderman, 1976). Il peut tuer la plus grande partie d'une population larvaire en 2 à 4 jours (Sinderman et Rosenfield, 1967). Les larves cessent de se développer et meurent rapidement après l'infection.

Haliphthoris milfordensis Vishniac, 1958

Ce Champignon a été découvert par Ganaros (1957) et décrit par Vishniac (1958). Il s'agit d'une Saprolégniale qui se développe dans les oeufs et les embryons du Gastéropode marin *Urosalpinx cinerea*. *H. milfordensis* forme des thalles filamenteux, ramifiés et holocarpiques, se divisant en sous-thalles qui évoluent en sporanges. Des zoospores biflagellées, monoplanétiques, sont émises de ces sporanges par un tube. *H. milfordensis* peut avoir un certain intérêt car *Urosalpinx cinerea* est un Gastéropode perforant, s'attaquant aux Bivalves et considéré comme un des plus grands prédateurs des jeunes Huîtres.

(*) Au cours du même colloque, Meynadier, Amargier et Vey ont signalé un Hyphomycète, appartenant au genre *Fusarium*, qui envahit, en élevage, les pontes de l'Escargot *Helix aspersa*.

Verticillium chlamydosporium Goddard, 1913

Cet Hyphomycète dont les hyphes grêles (2 à 3 µm de large) sont faiblement septées, envahit les oeufs de la Limace *Agriolimax agrestis*. Identifié en Angleterre par Goddard en 1913, son existence parasitaire a été démontrée par Tervet et Esslemont (1938). Sur les hyphes, à l'extrémité de phyallides simples ou ramifiées se forment des spores arrondies qui, le plus souvent, se détachent au fur et à mesure de leur différenciation, sans constituer de chapelet. Un autre moyen de reproduction consiste en de volumineuses chlamydospores septées.

Les oeufs parasités sont opaques, d'une teinte variant du jaune au brun noir, le noyau est dégénérescent et lobé. Goddard a constaté que, dans la nature, un nombre élevé d'oeufs sont stérilisés par le Champignon qui pourrait jouer un rôle dans le contrôle naturel des populations de Limaces.

LES CHAMPIGNONS PARASITES DE LA COQUILLE

Dans ce groupe, deux espèces seulement ont été étudiées avec précision : *Ostracoblabe implexa* et *Althornia crouchii*, toutes deux pathogènes de *Ostrea edulis* ; les autres représentants sont moins connus.

Une mucorale non déterminée recueillie par Johnson et Anderson (1962) dans des débris de coquilles vides de *Anomia simplex* paraît difficile à intégrer dans cette synthèse.

Ostracoblabe implexa Bornet et Flahault, 1889

La description de ce Champignon donnée par Bornet et Flahault (1889) a été confirmée par les récentes études de Alderman et Jones (1967-1971) réalisées à partir de cultures.

Le mycélium est constitué par de grêles hyphes rectilignes ou légèrement flexueuses de 1,5 à 2,5 µm de diamètre qui se renflent à intervalles irréguliers (40 à 100 µm) pour former des prochlamydospores de 3 à 5 µm de large (plus rarement 8 à 12 µm), se transformant elles-mêmes en chlamydospores à basse température.

Althornia croochii Jones et Alderman, 1971

Isolé par Jones et Alderman (1967) à partir de coquilles d'Huîtres malades, ce Champignon a d'abord été considéré comme étant une phase du développement de *Ostracoblabe implexa*. En 1971, Jones et Alderman séparent les deux fungi pathogènes de *Ostrea edulis*, sans toutefois pouvoir dire s'ils présentent des liens de parenté. La même année, ces auteurs (Alderman et Jones, 1971) constatent que ces deux Champignons euryhalins ont les mêmes besoins nutritifs, que leur croissance est maximale à 30°C et est inhibée à la lumière. Enfin, Alderman (1976), après de nouvelles observations, conclut qu'il n'existe aucune relation phylétique entre *Ostracoblabe implexa* et *Althornia crouchii*.

A. crouchii est constitué par des thalles monocentriques libres, se transformant en sporanges de 30 à 120 µm de diamètre enveloppés d'une épaisse paroi laminée. A maturité, des

zoospores biflagellées s'échappent des sporanges. En dépit de sa simplicité morphologique, ce Champignon pose une énigme systématique que les récentes analyses ultrastructurales n'ont pas résolue (Alderman, 1976).

Ostracoblabe implexa et *Althornia crouchii* sont impliqués, le long des côtes ouest de l'Europe, dans une maladie de la coquille appelée "maladie du pied" ou "maladie de la charnière". Ils peuvent être une importante cause de mortalité à la belle saison pour *Ostrea edulis* ; ils prolifèrent plus exceptionnellement dans la coquille de *Crassostrea angulata* (Ranson, 1936 ; Cole et Waugh, 1956). Une sévère épidémie due à ces Champignons a sévi en 1930 en Hollande, des exportations ont propagé l'enzootie en France, en Angleterre, en Allemagne (Cole, 1950 ; Korringa, 1951). Bien que sa présence puisse passer inaperçue, les fungi responsables de la "maladie du pied" existent à l'état endémique sur la plupart des côtes ouest-européennes.

Ces Champignons perforants se nourrissent aux dépens de la matrice organique de la coquille qu'ils finissent par perforer. Il se produit alors une irritation des tissus qui se traduit par un abondant dépôt de conchyoline. Cette protéine cornée est un aliment idéal pour les thallophytes qui se mettent à croître rapidement. Le développement de la maladie peut être facilement suivi : de petites taches blanchâtres d'abord isolées se réunissent en plages, s'épaississent en verrucosités qui déforment profondément la coquille. La fixation du muscle sur la coquille est alors compromise ; l'Huître a des difficultés, puis une incapacité à fermer ses valves et meurt (Alderman, 1976).

Didymella conchae Bonar, 1936

Ce Champignon a été trouvé par Bonar sur différents Mollusques récoltés dans la Baie de San Francisco.

A l'inverse de plusieurs autres fungi parasites de Mollusques, cet Ascomycète ne pose pas de problème systématique. Il est en effet bien caractérisé par des périthèces globuleux isolés (150-200 µm) contenant des paraphyses et des asques à 8 ascopores bicellulaires (15-20 x 5-7 µm), des pycnides globuleuses (85-110 µm) à conidiophores simples portant des conidies bacilliformes (2,3-3,5 x 1-1,5 µm). *Didymella conchae* attaque, déforme, défigure les coquilles, rendant leur détermination difficile sans qu'il semble y avoir un réel préjudice pour l'animal lui-même.

Monilia ou *Saccharomyces ?*

Un Champignon bourgeonnant, levuriforme, indéterminé a été trouvé par Voisin (1931) dans la coquille des Huîtres hollandaises. Il déclenche une maladie dont le syndrome rappelle celui de la "maladie du pied".

TABLEAU I : PRINCIPAUX CHAMPIGNONS PARASITES DE MOLLUSQUES

Localisation dans l'hôte	Champignons	Position systématique	Mollusque-hôte (M) marin (T) terrestre		Répartition géographique
Oeufs et larves	Sirolpidium zoophthorum Vishniac, 1955	Lagénidiales	G. venus G. crassostrea	(M) (M)	Etats-Unis (élevage)
	Haliphthoros milfordensis Vishniac, 1958	Saprolégniales	Urosalpinx cinerea	(M)	Etats-Unis
	Verticillium chlamydosperium Goddard, 1913	Fungi imperfecti	Agriolimax agrestis	(T)	Angleterre
Coquille	Ostracoblabe implexa Bornet et Flahault 1889	?	Ostrea edulis Crassostrea angulata	(M) (M)	Europe
	Althornia crouchii Jones et Alderman, 1971	?	Ostrea edulis Crassostrea angulata	(M) (M)	Europe
	Didymella conchae Bonar, 1936	Ascomycètes	Acmaea sp.	(M)	Etats-Unis
	Monilia ou Saccharomyces, Voisin, 1932	?	Ostrea sp.	(M)	France
Tissus mous	Dermocystidium marinum Mackin et coll., 1950	Labyrinthulales (?) Apicomplexa (?)	Crassostrea virginica et Bivalves divers	(M)	Etats-Unis, surtout
	Labyrinthula thaisi Cox et Mackin, 1974	Labyrinthulales	Thais haemastoma	(M)	Etats-Unis
	Thanatostrea polymorpha Franc et Arvy, 1969	Labyrinthulales	Crassostrea angulata	(M)	Europe, surtout
	Thraustochytrium inglei Quick, 1972	Saprolégniales	Crassostrea virginica	(M)	Etats-Unis
	Leptolegnia marina Atkins, 1929	Saprolégniales	Barnea candida Cardium echinatum	(M) (M)	Royaume-Uni
	Sterigmatomyces halophilus Fell, 1966	Fungi imperfecti	Crassostrea gigas	(M)	Canada
	Nocardia matruchoti Petit, 1921	Actinomycètes	Ostrea edulis	(M)	Europe



LES CHAMPIGNONS PARASITES DES TISSUS MOUS

Ce sont les plus nombreux et l'un d'entre eux *Dermocystidium marinum* est considéré aujourd'hui comme un des pathogènes les plus importants de l'huitre.

Nous n'insisterons pas sur un champignon levuriforme colorant les huîtres en rose étudié par Hunter (1920) dans les ostreicultures de la Nouvelle Angleterre. Cette levure, sans grande importance dans les conditions naturelles, prolifères lors du transport des huîtres par bateaux.

+ *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen et Collier, 1950

C'est essentiellement un parasite de l'Huître américaine, *Crassostrea virginica*, mais il a été identifié chez d'autres huîtres et, sporadiquement, dans de nombreux bivalves appartenant à plusieurs familles (Johnson et Sparrow, 1961). Les huîtres parasitées se rencontrent surtout aux Etats-Unis, sur la côte Sud-Est et dans le Golfe du Mexique. Le test de Ray (1952) permet de diagnostiquer précocement les infections à *D. marinum*.

a) Cycle et structure

Le cycle a été décrit par plusieurs auteurs (Mackin, 1962 ; Perkins et Menzel, 1966 et 1967). La spore évolue en un thalle uninucléé, à grande vacuole centrale. Des mitoses synchrones donnent naissance à 8, 16 ou 32 aplanospores qui propagent la maladie dans l'hôte. En culture sur thioglycollate, un deuxième type d'évolution consiste en la formation d'hypnospores qui se clivent après multiplication nucléaire pour donner des zoospores biflagellées. Celles-ci s'échappent par un pore et infestent de nouvelles huîtres. Mackin, Owen et Collier (1950) ont en outre observé, au cours du cycle, des cellules mobiles se déplaçant sur des tractus mucoîdes.

Les descriptions de Perkins (1959 et 1976) ont permis une bonne connaissance des ultrastructures de différents stades de *D. marinum* : thalle immature, découpage du sporangium, sporulation. La zoospore (Perkins, 1976) est caractérisée par la présence simultanée de deux flagelles insérés sur des centrioles typiques et d'un complexe apical comprenant un conoîde, des rhoptries et micronèmes.

b) Position systématique

Selon le caractère pris en considération, la position systématique de *D. marinum* a varié. En 1954, Sprague le classe parmi les Haplosporidies. La présence d'hypnospores fonctionnant comme des sporanges et donnant soit des aplanospores soit des zoospores biflagellées conduit Perkins et Menzel (1966 et 1967) à le rapprocher des

Saprolégniales et, plus spécialement, des Thraustochytriaceae. A la même époque, Mackin et Ray (1966) suivent l'évolution de *D. marinum in vitro* et constatent la présence de stades amoeboïdes étirés qui se réunissent en un réseau et des cellules se déplaçant sur des tractus mucoïdes, autant de caractères de Labyrinthulales ; ils proposent alors le remplacement de *D. marinum* par le binome *Labyrinthomyxa marina*. La présence de lomasomes et d'enveloppe cellulaire épaissie à tous les stades du cycle confèrent également au parasite des caractères fongiques.

En 1976, au cours d'observations ultrastructurales, Perkins décrit dans la zoospore de *D. marinum* un complexe apical (avec conoïde, rhoptries et micronèmes) et, en dépit de l'appareil flagellaire, le classe parmi les Sporozoa Apicomplexa.

c) Action pathogène sur les huitres

D. marinum peut causer des dégats considérables chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Andrews et Hewatt, 1957). L'infestation se fait à travers la paroi intestinale et, peut être, à travers le manteau. L'épithélium est détruit, tous les tissus sont envahis et endommagés ; des foyers nécrotiques forment de multiples abcès (Mackin, 1951 ; Sinderman, 1970). Le développement gonadique est inhibé, la croissance est retardée, l'huître ne referme plus ses valves, elle "baille", c'est la "gaping disease" (Menzel et Hopkins, 1955).

La répartition de la dermocystidiase est liée à deux facteurs : température et salinité. La mortalité s'élève pendant les mois d'été, diminue en hiver plus en raison d'un ralentissement du métabolisme du parasite que de son élimination de l'hôte (Andrews et Hewatt, 1957). *D. marinum* ne se développe qu'au-dessus de 25°C ce qui explique sa distribution le long des côtes est-américaines. D'autre part, la mortalité diminue pour des salinités inférieures à 15 ‰ ; cependant, les expériences de laboratoire montrent que *D. marinum* a un degré de tolérance assez élevé à l'égard de la salinité (Mackin, 1951). Le développement de la dermocystidiase durant la saison chaude et les périodes de fortes salinités a une implication sur l'ostreiculture dans les zones d'enzootie : Andrews et Hewatt (1957) recommandent d'ensemencer à l'automne. Ces mêmes auteurs indiquent enfin que l'âge et la taille des huîtres influent sur les infections.

+ *Labyrinthula thaisi* Cox et Mackin, 1974.

Cette labyrinthulale a été isolée des branchies du Gastéropode *Thais haemastoma* par Cox et Mackin (1974), son cycle assez complexe comprend deux phases distinctes. Selon les auteurs, ce champignon est plus un commensal qu'un parasite.

+ *Thanatostrea polymorpha* Franc et Arvy, 1969

T. polymorpha provoque la maladie des branchies et des palpes des huîtres portugaises sur les côtes européennes (Franc et Arvy, 1969 et 1970) ; Comps,1969. En 1969, Franc et Arvy n'excluaient pas la possibilité d'un rapprochement entre ce parasite et *Dermocystidium marinum*. Mais récemment (cf. présent colloque), Comps et Duthoit attribuent une origine virale à la maladie de *Crassostrea angulata*.

+ *Thraustochytrium inglei* Quick, 1972.

Cette Saprolégniale peut provoquer des mortalités au début de l'été chez *Crassostrea virginica* en Floride (Quick, 1972).

+ *Leptolegnia marina* Atkins, 1954

Cette Saprolégniale a été décrite chez les Mollusques (Atkins, 1954) mais avait été au préalable signalée sans être nommée dans les oeufs et les embryons du Crustacé *Pinnotheres pisum* (Atkins, 1929). Chez *Barnea candida* et *Cardium echinatum*, *L. marina* forme des thalles filamenteux et ramifiés sur lesquels se différencient des sporanges. Les zoospores (8-14 µm) sont biflagellées. Une reproduction sexuée est assurée par des oogones (17-30 µm) et des anthéridies hypogynes. Chaque oogone est rempli par une seule oospore. Le rôle pathogène de ce champignon n'est pas entièrement prouvé.

+ *Sterigmatomyces halophilus* Fell, 1966.

Ce champignon levuriforme provoque des pustules et des abcès dans le manteau de *Crassostrea gigas* (Sawyer et Meyer, 1977). *S. halophilus* a été isolé en culture sans qu'il soit possible d'établir un lien entre sa présence et la maladie de l'huître japonaise.

+ *Nocardia matruchoti* Pettit, 1921.

Il s'agit d'un parasite du tube digestif, exceptionnellement des branchies, des huîtres des Côtes d'Europe. Il provoque une aplasie tissulaire avec perte de poids *N. matruchoti* est classé parmi les Actinomycètes que certains rejettent des Fungi et placent parmi les Bactéries filamenteuses.

CONCLUSION

Des épizooties graves parfois foudroyantes ont été attribuées à des formes fongiques. Deux cas sont bien connu des ostreiculteurs : la "maladie du pied" en Europe et la "gaping disease" aux Etats-Unis. Cependant, le nombre de Champignons identifiés vivant en parasites des Mollusques est peu élevé. De plus, certains d'entre eux ont un statut taxonomique incertain : par exemple ; *Dermocystidium marinum* est actuellement revendiqué par les protozoologistes, *Althornia crouchii* et *Ostracoblabe implexa* sont une énigme, l'affection à *Thanatostrea polymorpha* serait de nature virale.

La microscopie électronique peut aider dans certains cas à clarifier ces problèmes. A ce jour, seuls les caractères ultrastructuraux de *D. marinum* et *A. crouchii* sont connus. Or, dans les deux cas, la microscopie électronique a compliqué la question plus qu'elle ne l'a simplifiée.

La plupart des Champignons décrits ont été récoltés dans des Mollusques marins. Il est sûr qu'une prospection minutieuse aboutirait à l'identification d'autres espèces dans le milieu marin, mais aussi dans les oeufs, les larves et les adultes de Mollusques continentaux. Il est facile d'imaginer l'intérêt que soulèverait la découverte de Champignons décimant tel ou tel Mollusque vecteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALDERMAN D.J., 1976 - Fungal diseases of marine animals (in "Recent advances in aquatic mycology", *Jones E.B.G. Ed.*, 223-260, Flek Science, London).

ALDERMAN D.J. and JONES E.B.G., 1967 - Shell disease of *Ostrea edulis L. Nature, 216*, 797-798.

ALDERMAN D.J. and JONES E.B.G., 1971 - Physiological requierements of two marine Phycomycetes *Althornia crouchii* and *Ostracoblabe implexa. Trans. B. Mycol. Soc., 57*, 213-225.

ANDREWS J.D. and HEWATT W.G., 1957 - Oyster mortality studies in Virginia. II. The fungus disease caused by *Dermocystidium marinum* in oyster of Chesapeake bay. *Ecol. Monographs, 27*, 1-26.

ATKINS D., 1929 - On a fungus allied to the Saprolegniaceae found in the pea-crab *Pinnotheres. J. Marine Biol. Assoc. Unit. Kingdom (N.S.), 16*, 203-219.

ATKINS D., 1954 - Further notes on a marine member of the Saprolegniaceae, *Leptolegnia marina* n. sp. infecting certain invertebrates. *J. Marine Biol. Assoc. Unit. Kingdom* (N.S.), *33*, 613-625.

BONAR L., 1936 - An unusual ascomycete in the shells of marine animals. Univ. Calif. Publ. *Botany, 19*, 187-193.

BORNET E. et FLAHAULT C., 1889 - Sur quelques plantes vivant dans le test calcaires des Mollusques. *Bull. Soc. Bot., Fr. Sér., 2*, 11, 147-176.

COLE H.A., 1950 - Shell disease in re-laid French Oysters. *Nature, 166*, 19-20.

COLE H.A., WAUGH G.D., 1956 - Shell desease in Portuguese oysters. *Nature, 178*, 422.

COMPS M., 1969 - Observations relatives à l'affection branchiale des huitres portugaises (*Crassostrea angulata* Lmk). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, *33*, 151-160.

COX B.A. and MACKIN J.G., 1974 - Studies on a new species of *Labyrinthula* (Labyrinthulales) isolated from the marine Gastropod *Thais haemastoma floridana*. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, *93*, (1), 62-70.

DAVIS H.C. LOOSANOFF V.L. WESTON W.H. and MARTIN C., 1954 - A fungus disease in clam and oyster larvae. *Sciences*, *120*, 36-38.

FRANC A. et ARVY L., 1969 - Sur *Thanastostrea polymorpha* n.g.n. sp., agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. *C.R. Acad. Sci.*, *268*, 3189-90.

FRANC A. et ARVY L., 1970 - Données sur l'évolution de la "maladie des branchies" chez les huîtres et sur son agent causal : *Thanatostrea polymorpha* Franc et Arvy, 1969. *Bull. Biol.*, *104* (1), 3-19.

GANAROS A.E., 1957 - Marine fungus infecting eggs and embryos of *Urosalpinx cinerea*. *Science*, *125*, 1194.

HUNTER A.C., 1920 - A pink yeast causing spoilage in oysters. U.S. *Depart. of Agricul. Bull.*, *819*, 1-24.

JOHNSON T.W. and SPARROW F.K., 1961 - Fungi in Oceans and Estuaries, Weinheim Published by J. Cramer, N.Y., 698 p.

JONES E.B.G. and ALDERMAN D.J. 1971 - *Althornia crouchii* gen. et sp. nov., a marine biflagellate fungus. *Nova Hedwigia*, *21*, 381-399.

KORRINGA P. 1951 - Investigations on shell-disease in the oyster, *Ostrea edulis* L. Conseil permanent int. pour l'Explt. de la Mer, Rapports et Procès-verbaux des Réunions, *128*, 50-54.

MACKIN J.G., 1951 - Histopathology of infection of *Crassostrea virginica*(Gmelin) by *Dermocystidium marinum*, Mackin, Owen and Collier. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, *1*, 72-87.

MACKIN J.G., 1962 - Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other micro-organisms in Louisiana. *Publ. Inst. mar. Sci., Univ. Texas*, *7*, 132-229.

MACKIN J.C., OWEN H.M. and COLLIER A., 1950 - Premiminary note on the occurrence of a new protistan parasite *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, *111*, 328-329.

MACKIN J.G. and RAY S.M. 1966 - The taxonomic relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen et Collier. *J. Invertebr. Pathol.*, *8*, 544-545.

MENZEL R. and HOPKINS S.H. 1955 - The growth of oysters parasitized by the fungus *Dermocystidium marinum* and by the Trematode *Bucephalus cuculus*. *J. Parasitol*, *41*, 333-342.

PERKINS F.O., 1969 - Ultrastructure of vegetative stages in *Labyrinthomyxa marina* (= *Dermocystidium marinum)* a commercially significan Oyster pathogen. *J. Invertebr. Pathol.*, *13*, 199-222.

PERKINS F.O., 1976 - Fine structure of lower marine and estuarine Fungi. in "Recent advances in aquatic mycology", JONES E.B.G. Ed., 279-312, Elek Science, London.

PERKINS F.O. 1976 - Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. *I* - Fine structure of the conoid and other sporozoan like organelles. *J. Parasitol.*, *62*, 6, 959-974.

PERKINS F.O. and MENZEL R.W., 1966 - Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Nat. Schellfisch. Ass.*, *56*, 23-30.

PERKINS F.O. and MENZEL R.W., 1967 - Ultrastructure of sporulation in the Oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. *J. Invertebr. Pathol.*, *9*, 205-229.

PETTIT A., 1921 - Mycose de l'huître comestible. *Bull. Soc. Centrale d'Agr. Pêche*, *28*, 31-32.

QUICK J.A. (Jr), 1972 - A new Thraustochytrideacous fungi endoparasitic to the american oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, in Florida. SIP Newsletter, 4, 3, 13.

RANSON G., 1936 - La maladie du "pied" chez *Cryphaea angulata* Lmk. en 1935, dans la région de Marennes. *C.R. Soc. Biol.*, *121*, 540-542.

RAY S.M., 1952 - A culture technique for diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen et Ollier in Oysters. *Science*, *116*, 360-361.

SAWYER T.K. and MEYER S.A., 1977 - A nonfilamentous marine fungus, *Sterigmatomyces halophilus*, from mantle fluid of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, *29*, 395-396.

SINDERMANN C.J., 1970 - Principal diseases of marine fish and shellfish. *Acad. Press N.Y.*, 369 p.

SINDERMANN C.J. and ROSENFIELD A., 1967 - Principal disease of commercially important marine bivalve Mollusc and Crustacea. *U.S. Fish Wildlife Serv. Fishery Bull.*, *66*, 335-385.

SPARROW F.K., 1976 - The present status of classification in biflagellate Fungi (in "Recent Advances in Aquatic Mycology, Jones E.B.G. Ed., 213-222).

SPRAGUE V., 1954 - Protozoa. Gulf of Mexico, its origin, waters, and marine life. *USFWS Fish Bull. N° 89*, *55*, 243-256.

TERVET I.W. and ESSLEMONT J.M.,1938 - A fungous parasite of the eggs of the grey field slug. *J. Quekett Microscop. Club (4)*, *1*, 1-3.

VISHNIAC H.S., 1955 - The morphology and nutrition of a new species of *Sirolpidium*, *Mycologia*, *47*, 633-645.

VISHNIAC H., 1958 - A new marine Phycomycete. *Mycologia*, *50*, 66-79.

VOISIN P., 1931 - La maladie des huîtres de Zélande. *Rev. Trav. Office des Pêches Maritimes*, *4*, 221-222.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 115 à 120

ROLE ET PLACE DES MOLLUSQUES DANS LE CYCLE EVOLUTIF DES CESTODES

par Louis Euzet (*)

RESUME

A la lumière de données récentes sur le rôle des Mollusques dans la transmission des plathelminthes sont discutées l'importance et la situation des Gastéropodes dans le cycle des *Cyclophyllidea*. L'étude des *Tetraphyllidea* est résumée et des hypothèses sont formulées concernant la situation des Mollusques, notamment des Céphalopodes, dans le cycle de ces vers plats. Une base nouvelle est fournie pour la spécificité de *Proboscidosaccus enigmaticus*. En rapport avec le métacestode de *Tylocephalum*, est discutée la possibilité de l'origine parasitaire de perles et du cycle de ces *Lecanicephalidea*.

ROLE AND SITUATION OF MOLLUSCS IN THE LIFE CYCLE OF CESTODA

SUMMARY

Report on recent informations about the role of Molluscs in the Flatworm transmission, we discuss the importance and situation of Gasteropods in the life cycle of the *Cyclophyllidea*. The study on the *Tetraphyllidea* is resumed and hypothesesare given about the situation of Molluscs, especially Cephalopods, in the life cycle of these Flatworms. A new basis for the specific attribution of *Proboscidosaccus enigmaticus* is given. In the reference to the metacestode of *Tylocephalum*, we discuss the possibility of a parasitic origin for pearls and for the life cycle of these *Lecanicephalidea*.

L'importance des Mollusques comme hôtes intermédiaires dans le cycle des Cestodesest réduite.

En effet, parmi les 13 Ordres que l'on reconnaît dans cette classe, deux seulement, *Tetraphyllidea* et *Lecanicephalidea*, ont des espèces dont une partie du développement larvaire peut se dérouler dans un Mollusque. Quelques Cestodes de trois ordres, *Diphyllidea*, *Tetrarhynchidea* et *Cyclophyllidea*, ont aussi un Mollusque impliqué dans le cycle. Mais, mis à part les *Cyclophyllidea*, on ne connaît pas le rôle et la place exacte de ces Invertébrés dans la transmission.

(*) Laboratoire de Parasitologie Comparée, U.S.T.L., Place E. Bataillon, 34060 Montpellier Cédex (France)

Parmi les ordres restants, ou bien on n'a jamais signalé de forme larvaire chez les Mollusques, ou bien le cycle évolutif reste encore inconnu *(Proteocephalidea, Tetrabothridea, Aporidea, Nippotaeniidea, Pseudophyllidea, Haplobothridea, Caryophyllidea, Spathebothridea).*

Les mollusques jouent un rôle limité dans le cycle des *Cyclophyllidea* qui sont des parasites de Vertébrés terrestres (Mammifères, Oiseaux, Reptiles et Batraciens).

Chez quelques Gastéropodes pulmonés terrestres (surtout Limaces et *Zonitidae*), on rencontre le cysticercoïde, larve infestante de Cestodes *Davaineidae* et *Dilepididae*.

Quelques pulmonés aquatiques du genre *Lymnaea* entrent comme hôtes intermédiaires dans le cycle de Cestodes *Hymenolepididae* parasites d'Oiseaux aquatiques.

Nous pensons que, dans tous les cas, les Mollusques ne sont pas les hôtes intermédiaires primitifs mais qu'ils représentent une nouvelle possibilité d'infestation favorable au parasite. En effet, les Cestodes de ces familles ont un cycle passant soit par des Annélidés Oligochètes *(Dilepididae)*, soit des Arthropodes *(Davaineidae* et *Hymenolepididae).*

Parmi les Cestodes de Sélaciens à cycle aquatique, quelques larves d'*Echinobothrium (Diphyllidea)* ont été signalées chez les Mollusques. Le cycle de ces Cestodes étant encore inconnu, on ne peut connaître l'importance des Mollusques dans la transmission de ces parasites.

Dollfus (1923-1964) a dressé le catalogue des larves de *Tetrarhynchidea* trouvées chez les Mollusques. Elles paraissent rares et même exceptionnelles sauf chez les Céphalopodes où l'on a assez souvent récolté des larves de *Nybelinia*. Mais les larves de *Nybelinia* sont souvent libres et il n'est pas rare de les rencontrer sur les branchies de Téléostéens. Les Céphalopodes, hôtes occasionnels, n'auraient qu'un rôle accidentel dans le cycle des *Tetrarhynchidea* parasites de Sélaciens.

C'est surtout parmi les *Tetraphyllidea*, eux aussi parasites de Sélaciens, que l'on a signalé des cycles évolutifs avec des Mollusques comme hôtes intermédiaires.

La larve plérocercoïde de *Tetraphyllidea*, larve du type *Scolex pleuronectis* = *Scolex polymorphus*, a été signalée en 1903 par Anantaraman à Madras (Inde) chez un Lamellibranche *Meretrix casta* et chez deux Gastéropodes *Harpa* sp. et *Oliva* sp.

Des stades larvaires de *Phyllobothriidae* du genre *Echeneibothrium* ont été décrits par C.E. et N. Mac Ginitie sur les côtes de Californie chez plusieurs Lamellibranches *Schizothaerus nuttali* et plus rarement *Macoma nasuta* et *Paphia staminea*. Une larve d'*Echeneibothrium* a aussi été signalée par Hyman (1851) dans un "clam" du Puget sound. Sur les côtes de Californie, Sparks et Chang (1966) ont retrouvé des larves attribuées à un *Echeneibothrium* enkystées dans les tissus de *Venerupsis staminea*.

Toutes ces larves sont données comme appartenant à des Cestodes du genre *Echeneibothrium* car le scolex présente une volumineuse ventouse apicale assimilée au myzorhynchus des formes adultes et quatre bothridies subdivisées en une ou deux séries de logettes par des cloisons musculaires.

Des bothridies loculées existent aussi chez les espèces du genre *Rhinebothrium* mais le scolex des adultes est dépourvu de myzorhynchus.

Cependant, il semble que toutes les larves de *Tetraphyllidea*, comme *Scolex pleuronectis*, possèdent une ventouse apicale, ventouse qui disparaît au début du développement post-larvaire. Il est donc difficile de dire avec certitude si ces larves à bothridies loculées appartiennent à une espèce du genre *Echeneibothrium* et *Rhinebothrium*.

Les *Echeneibothrium* n'ont eté jusqu'à présent trouvés que chez des *Rajidae* ; les *Rhinebothrium* sont des parasites de *Dasyatidae* et *Myliobatidae* (exceptionnellement de *Rajidae*, *Psammobatis*).

Les Mollusques peuvent jouer un rôle dans le cycle, les Raies et les Pastenagues (surtout ces dernières) étant de grosses consommatrices de coquillages.

Un parasite énigmatique de *Mactra solida* a été décrit en 1943 par Gallien sous le nom de *Proboscidosaccus enigmaticus*. Des parasites identiques ont eté retrouves toujours chez *Mactra solida* de l'estuaire de la Loire et étudiés par Anthouard (1963). Il reconnaît un stade larvaire de Cestode qu'il rapproche des larves attribuées à des *Tetraphyllidea* récoltées chez les Cétacés et les Pinnipèdes. Dollfus a repris cette question en 1964.

L'étude que nous avons faite d'une larve semblable trouvée dans une Huître *(Ostrea edulis)* nous permet de l'attribuer à *Sphaerobothrium lubeti* Euzet, 1959, *Phyllobothriidae* parasite de la valvule spirale de *Myliobatis aquila*.

Parmi les *Lecanicephalidea* (qui étaient jusqu'en 1952 inclus dans les *Tetraphyllidea*), des larves attribuées à des espèces du genre *Tylocephalum* ont depuis longtemps été signalées chez les Lamellibranches - et en particulier chez l'Huître perlière *Margaritifera vulgaris* sur les côtes de Ceylan : Herdman et Hornell (1906), Shipley et Hornell (1906), Jameson (1912), Southwell (1924).

Une larve de même type a été récoltée par Seurat (1904-1906) chez *Margaritifera margaritifera* aux îles Gambier dans le Pacifique Sud. Dollfus (1923) a rapporté à des larves de *Tylocephalum* des parasites de *Meleagrina occa* et *M. irridians* pêchées sur les côtes de Bossi-Bé (Madagascar).

La systématique des *Lecanicephalidae* adultes, parasites de Sélaciens, surtout Trygoniformes, est encore incertaine et le cycle est inconnu. Nous continuerons à nommer ces larves *Tylocephalum* sans essayer de les rapporter à une espèce précise.

En 1963, Sparks, puis en 1966, Cheng, retrouvent des larves de *Tylocephalum* chez *Crassostrea virginica* à Hawaï ; ensuite, Burton les signale chez ces mêmes Huîtres sur les côtes de Floride et du Maryland. A Hawaï, une larve de ce type a été trouvée chez *Tapes decussatus*.

Chez *Crassostrea*, Cheng a très bien décrit cette larve, les réactions tissulaires de l'hôte et la dégénérescence du parasite. Cependant, Cheng (1966) considère comme le coracidium de *Tylocephalum* une larve ciliée récoltée à Hawaï sur les branchies de *Crassostrea*. Cette larve n'est pas une larve de Cestode et ne ressemble pas à un coracidium. En effet, il n'existe pas les 6 crochets caractéristiques de l'oncosphère et le tégument épithélial cilié ne peut être comparé à l'embryophore cyncytial cilié qui existe chez le coracidium des *Pseudophyllidea* et *Tetrarhynchidea*. En outre, dans les élevages que nous avons tentés pour élucider les cycles de *Tetragonocephalum trygonis*, *Lecanicephalidea* voisin de *Tylocephalum*, nous n'avons jamais observé de coracidium nageant.

Ainsi, le cycle des *Lecanicephalidea* reste inconnu et nous ne pouvons discuter du rôle et de la place des Mollusques dans ce cycle.

Chez les Lamellibranches, ces larves, surtout celles de *Tylocephalum*, sont-elles à l'origine des perles naturelles ? Herdman a en effet émis l'hypothèse que les larves de Cestodes trouvées dans les tissus de *Margaritifera* pouvaient être le point de départ des perles. Il pense même avoir observé les restes de ces larves au centre de jeunes perles.

Par la suite, cette hypothèse a été très discutée. Certains comme Southwell, estimant l'origine parasitaire des perles comme possible, les autres, Jameson en particulier, la niant en soulignant l'absence de Cestode larvaire au coeur des perles en formation.

Le cycle des *Tetraphyllidea* n'étant pas entièrement résolu et celui des *Lecanicephalidea* encore inconnu, on ne sait pas comment leur larve parvient dans le Mollusque. Cependant, dans la majorité des cas, les larves sont localisées dans le tissu conjonctif de la masse viscérale et jamais dans le manteau où se forment les perles.

Les réactions des tissus de l'hôte qui apparaissent autour des larves de *Tylocephalum* (Seurat - Cheng) ressemblent beaucoup aux réactions que l'on observe autour de certaines cercaires qui ont pénétré accidentellement, semble-t-il, dans un Lamellibranche. Ainsi, en l'absence de toute preuve expérimentale, on ne peut actuellement répondre à la question.

Depuis longtemps on a signalé chez les Céphalopodes des larves plérocercoïdes du type *Scolex pleuronectis* ou des larves plus avancées dans leur développement.

Nous ne donnerons pas la longue liste de ces observations qui ont été à plusieurs reprises cataloguées par Dollfus entre 1923 et 1964.

Cependant, d'après cette littérature, il semble qu'il existe deux catégories de larves d'après leur localisation dans les Céphalopodes :

- des plérocercoïdes à diverses étapes du développement qui sont libres dans l'intestin, l'estomac et le coecum spiral. On peut récolter ces larves dans la cavité palléale où elles sont peut-être parvenues après la mort de l'hôte ;
- des larves de *"Dinobothrium"* encapsulées dans le tissu conjonctif lâche qui entoure la paroi intestinale.

Nous avons observé (Euzet, 1959), parmi les plérocercoïdes libres dans l'intestin d'*Ilex coindeti*, des stades intermédiaires entre de petits *Scolex pleurenectis* identiques à ceux que l'on rencontre dans l'intestin des Téléostéens et des Crustacés Décapodes et les grandes larves possédant un scolex avec une ventouse apicale, une ventouse accessoire et quatre bothridies à bord plissé. Nous avons rapporté ces larves à des *Tetraphyllidea* du genre *Phyllobotrhium* et plus particulièrement à *P. tumidum* Linton, 1922, qui se rencontre adulte dans la valvule spirale de plusieurs Requins pélagiques *Isurus, Lamna.*

Les larves de type *"Dinobothrium"* à scolex caractéristique appartiendraient à des Cestodes *Tetraphyllidea* parasites des mêmes Requins pélagiques, mais aussi *Cetorhinus maximus.*

Néanmoins, il ne faut pas exclure l'hypothèse que certaines de ces larves puissent représenter les larves de *Tetrabothridea* qui parasitent des Oiseaux et des Mammifères marins. Mais le cycle de ces Cestodes, dont la position systématique est difficile à préciser, est entièrement inconnu.

Ainsi, divers Mollusques Lamellibranches et Céphalopodes peuvent jouer un rôle dans le cycle évolutif de *Tetraphyllidea*. Il reste à déterminer leur place.

Le cycle des *Tetraphyllidea* n'a jamais encore été réalisé expérimentalement dans sa totalité. Nous avons montré (Euzet, 1959) que l'oeuf contenait, dans une coque mince non operculée, une oncosphère entourée par un embryophore non cilié. Ceci a été confirmé en microscopie électronique par Mokhtar - Masmouri (1977).

Nous avons aussi prouvé que l'oeuf embryonné de *Phyllobothrium lactuca* ingéré par un Copépode planctonique du genre *Acartia* éclot dans l'estomac. L'oncosphère traversant la paroi intestinale se transforme en procercoïde dans l'hémocoele du Copépode.

Ces résultats ont été confirmés par Mudry et Dailey (1971). Dans le Copépode *Tigriopus californicus*, ils ont obtenu, en partant des oeufs d'*Acanthobothrium olseni*, des larves procercoïdes. Ces larves ont atteint un stade plus avancé que celles de nos expériences puisqu'elles possèdent une ventouse apicale bien développée.

Mais, toujours, les Copépodes sont morts avant que ces larves n'aient évolué en stade infestant.

Nous avons alors deux possibilités :

- ou le procercoïde continue dans le Copépode son développement jusqu'à un stade plérocercoïde du type *Scolex pleuronectis*,
- ou ce procercoïde ne peut poursuivre son évolution que s'il est ingéré avec le Copépode dans un deuxième hôte intermédiaire où il atteint le stade plérocercoïde *(Scolex pleuronectis)*.

Quelques observations sont en faveur de la première hypothèse.

On a signalé des Copépodes naturellement infestés par des plérocercoïdes du type *Scolex pleuronectis*. Dans le cycle de nombreuses espèces de *Proteocephalidea* (Cestodes proches des *Tetraphyllidea*), le stade plérocercoïde ressemblant a un *Scolex pleuronectis* est atteint chez le Copépode hôte intermédiaire.

Dans la première hypothèse, les Poissons et les Crustacés (autres que les Copépodes porteurs de plérocercoïdes) ne seraient dans le cycle des *Tetraphyllidea* que des hôtes paraténiques ajoutés au cycle. Les Céphalopodes représenteraient alors des hôtes paraténiques de deuxième ordre.

Dans la deuxième hypothèse, le procercoïde avalé avec le Copépode, se transformerait en plérocercoïde dans l'intestin du deuxième hôte intermédiaire (Poisson ou Crustacé Décapode). Il faut cependant souligner la localisation intestinale de cette larve. Le Mollusque Lamellibranche pourrait être à la place de ce deuxième hôte intermédiaire et les Céphalopodes (qui s'infestent en consommant des Crustacés) représenter un hôte paraténique.

Mais, ces hypothèses demandent des vérifications expérimentales toujours difficiles à réaliser en milieu marin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(*) DOLLFUS R.Ph., 1964. - Enumération des Cestodes du Plancton et des Invertébrés marins (6° contribution). *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, *39* (3) : 329-379.

EUZET L., 1959. - Recherches sur les Cestodes Tétraphyllides des Sélaciens des Côtes de France. Thèse, Montpellier : 263.

(*) CHENG T.C., 1967. - Marine Molluscs as hosts for symbioses with a review of known parasites of commercially important species. *Advances in Marine Biology*, *5* : 424.

MUDRY D.R. et DAILEY M.D., 1971. - Postembryonic development of certain tetraphyllidean and trypanorhynchan Cestodes with a possible alternative life cycle for the order Trypanorhyncha. *Can. J. Zool.*, *49* : 1249-1253.

MOKHTAR-MAAMOURI F., 1976. - Etude ultrastructurale de la gamétogénèse et des premiers stades du développement de deux Cestodes *Tetraphyllidea*. Thèse, Montpellier : 224, 67 fig.

(*) On peut consulter une bibliographie complète de ces deux travaux.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 121 à 125

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU CYSTICERCOIDE DE *CHOANOTAENIA CRASSISCOLEX* VON LINSTOW, 1890, PARASITE D'*ARION LUSITANICUS*

par Claude Gabrion (*) et Joseph Jourdane (**)

RESUME

Des cysticercoïdes de *Choanotaenia crassiscolex* sont étudiés en microscopie photonique et électronique. La structure de la larve montre une forte analogie avec les cycticercoïdes de trois autres espèces de *Dilepididae*. Sont discutées la nature et l'origine de cette formation qui semble être une caractéristique des *Dilepididae*.

ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE CYSTICERCOID OF *CHOANOTAENIA CRASSISCOLEX* VON LINSTOW, 1890, FROM *ARION LUSITANICUS*

SUMMARY

Cysticercoids of *Choanotaenia crassiscolex* are examined by light and electron microscopy. The structure of the larvae show great similarity to the cysticercoids of three others species of *Dilepididae*. Particulary, theypresent the same surface coat which surround the cysticercoid. We discute the nature and the origin of this formation which seems to be a characteristic of the *Dilepididae*.

Dans les Pyrénées, *Choanotaenia crassiscolex* parasite de la Musaraigne terrestre *Sorex araneus* se rencontre à l'état larvaire, dans le rein ou le poumon d'*Arion lusitanicus* (Jourdane, 1972).

La larve de *Ch. crassiscolex* (fig. 1) est un cysticercoïde chez lequel la différenciation du scolex apparaît avant invagination. Le scolex est muni de 4 ventouses et d'un rostre armé de 20 crochets en 2 couronnes. Le cysticercoïde est dépourvu de cercomère. Comme les autres larves de Dilepididae déjà étudiés, *Paricterotaenia paradoxa* (Crowe, Burt et Scott,

(*) Laboratoire de Parasitologie Comparée, U.S.T.L., Place E. Bataillon, 34060 Montpellier (France)

(**) Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66000 Perpignan (France)

1974), *Anomotaenia constricta* (Gabrion, 1975), *A. brevis* (Gabrion, Plateaux et Quentin, 1976), le cysticercoïde est bien limité vers l'extérieur par une formation qui l'isole des tissus de l'hôte. En outre, le cysticercoïde n'est pas libre dans la cavité pulmonaire ou le rein mais enserré par les tissus du Mollusque.

Au microscope électronique, la structure du cysticercoïde de *Ch. crassiscolex* apparaît très proche de celle d'*A. constricta* (Gabrion et Gabrion, 1976), d'*A. brevis* et de *Paricterotaenia paradoxa*.

De part et d'autre de la vésicule cystique réduite, les parois cystiques externe et interne sont limitées par un cyncytium cytoplasmique recouvert de microtriches (fig. 2).

Comme chez les autres cysticercoïdes, on observe un gradient de différenciation des structures tégumentaires. Sur la paroi externe, le tégument est recouvert d'expansions dans lesquelles se rassemble un matériel dense (fig. 3). Près du pore antérieur, ces expansions sont plus hautes et annoncent les microtriches. A la limite de la paroi cystique interne et du scolex (fig. 4), leur structure correspond à celle des microtriches typiques. Sur le scolex, on observe deux types d'expansions, les unes filamenteuses, les autres plus épaisses (fig. 5). Au niveau des ventouses, la structure des microtriches rappelle celle des crochets du rostre (fig. 6).

Tableau n° 1 : Nature des hôtes intermédiaires chez les Dilepididae

Sous-famille	Espèce	Hôte intermédiaire	
		Espèce	Classe
Dilepidinae	*Dilepis undula*	*Lumbricus terrestris*	Oligochète
	Paricterotaenia paradoxa	*Allolobophora terrestris*	Oligochète
	Amaebotaenia spheroides	*Allolobophora chlorotica*	Oligochète
	Anomotaenia pyriformis	*Lumbricus variegatus*	Oligochète
	Anomotaenia constricta	*Pimelia sulcata*	Insecte (Coléoptère)
	Anomotaenia brevis	*Leptothorax nylanderi*	Insecte (Hyménoptère)
	Anomotaenia arionis	*Arion ater*	Mollusque
Dipylidiinae	*Choanotaenia estavarensis*	*Arion lusitanicus*	Mollusque
	Choanotaenia crassiscolex	*Arion lusitanicus*	Mollusque
	Choanotaenia infundibulum	*Musca domestica*	Insecte (Diptère)
	Choanotaenia infundibulum	*Geotrupes sylvaticus*	Insecte (Coléoptère)

L'enveloppe larvaire qui isole le cysticercoïde (fig. 7) est constituée d'une substance amorphe, dense, uniformément répartie autour du cysticercoïde ; elle donne à la larve sa forme sphérique. Au-dessus, accolée au tissu de l'hôte, on observe une autre couche de substance amorphe à l'intérieur de laquelle se voient des amas de structures lamellaires enchevê-

trées. A l'exception de ces amas lamellaires, cette structure est en tout point identique à celle observée par Crowe chez *Paricterotaenia paradoxa* et par nous-mêmes chez *A. constricta* et *A. brevis*.

Ainsi, mise à part l'évolution du cercomère, les cysticercoïdes de Dilepididae montrent une grande unité de structure. Cela est d'autant plus remarquable que ces larves se retrouvent aussi bien chez des Oligochètes que chez des Insectes ou des Mollusques, avec des localisations aussi différentes que la paroi du tube digestif, le rein ou le poumon (tableau n° 1).

L'un des problèmes les plus intéressants posés par les cysticercoïdes de Dilepididae concerne la nature et l'origine de l'enveloppe larvaire. Si l'on se réfère à la structure de l'oeuf, la partie la plus externe pourrait dériver de la membrane oncosphérale dont Rybicka (1973) a montré la nature pluristratifiée. Au-dessous, la substance amorphe correspondrait au ciment extracellulaire sécrété par la couche épithéliale intermédiaire de l'oncosphère. Son rôle serait de renforcer la cohésion de la membrane oncosphérale. On ne peut cependant pas exclure l'hypothèse d'une participation des tissus de l'hôte à l'élaboration de cette formation. Néanmoins, l'unité de structure, quelle que soit la nature de l'hôte ou du tissu parasité, semble indiquer une origine plus ontogénétique que réactionnelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CROWE D.G., BURT M.B.D. et SCOTT J.S., 1974. - On the ultrastructure oh the polycercus larva of *Paricterotaenia paradoxa* (Castoda : Cyclophyllidea). *Can. J. Zool.*, *52* (11) : 1397-1405.

GABRION C., 1975. - Etude expérimentale du développement larvaire d'*Anomotaenia constricta* (Molin, 1858) Cohn, 1900, chez un Coléoptère *Pimelia sulcata* Geoffr. *Z. Parasitenk.*, *47* : 249-262.

GABRION C. et GABRION J., 1976. - Etude ultrastructurale de la larve de *Anomotaenia constricta* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Z. Parasitenk.*, *49* : 161-177.

GABRION C., PLATEAUX L. et QUENTIN C., 1976. - *Anomotaenia brevis* (Clerc, 1902) Fuhrmann, 1908 Cestode Cyclophyllide, parasite de *Leptothorax nylanderi* (Forster), Hyménoptère, Formicidé. *Ann. Parasit. hum. comp.*, *51* (4) : 407-420.

JOURDANE J., 1972. - Etude expérimentale du cycle biologique de deux espèces de *Choanotaenia* intestinaux des *Soricidae*. *Z. Parasitenk.*, *38* : 333-343.

RYBICKA K., 1973. - Ultrastructure of the embryonic syncytial epithelium in a cestode *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, *66* : 9-18.

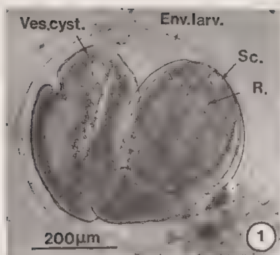
LEGENDE DES FIGURES

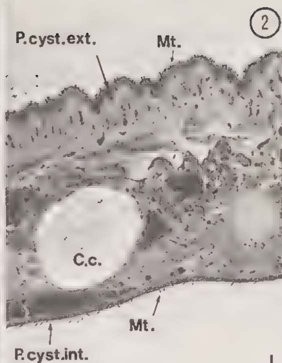
Fig. 1 - Cysticercoïde de *Ch. crassiscolex* dans la cavité pulmonaire du Mollusque. Env. larv. : enveloppe larvaire ; R. : rostre ; Sc. : scolex ; Ves. cyst. : vésicule cystique.

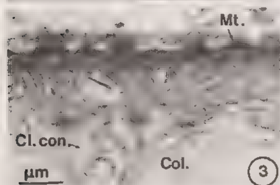
Fig. 2 - Ultrastructure de la paroi cystique externe (P. cyst. ext.) et de la paroi cystique interne (P. cyst. int.). C.c. : corpuscule calcaire ; Mt. : microtriche ; Sc. : scolex.

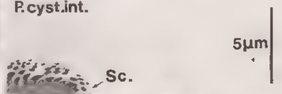
Fig. 3 - 4 - 5 - 6 - Gradient de différenciation des structures tégumentaires. Cl. con. : canal de connexion ; col. : fibres collagènes.

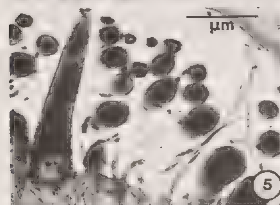
Fig. 7 - Détail de l'enveloppe larvaire.

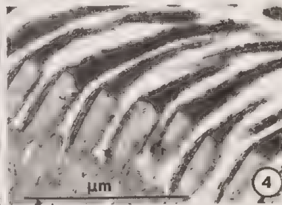

Ves.cyst.
Env.larv.
Sc.
R.
200µm
1

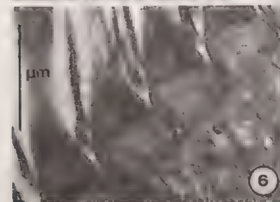

2
P.cyst.ext.
Mt.
C.c.
Mt.
P.cyst.int.

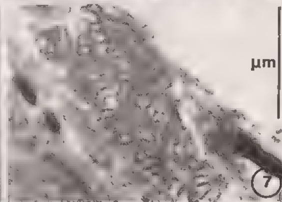

Mt.
Cl.con.
Col.
µm
3


5µm
Sc.


µm
5


µm
4


µm
6


µm
7

Haliotis, 8, 1977, (1979)
p. 127 à 135

EPIDEMIOLOGIE ECOLOGIQUE DE LA SCHISTOSOMOSE A *SCHISTOSOMA MANSONI* EN GUADELOUPE (ANTILLES FRANCAISES)

par Yves J. Golvan (*), Claude Combes (**),
Jacques Euzeby (***) et Bernard Salvat (****)

RESUME

En Guadeloupe, le seul vecteur de *S. mansoni* est *Biomphalaria glabrata*. Le mollusque est ubiquiste mais il n'est parasite que dans des zones restreintes. Certaines activités humaines favorisent l'infestation du mollusque par *S. mansoni*. Les rats sont aussi contaminés, spécialement ceux des mangroves "douces". Une nouvelle méthode de lutte biologique contre *B. blabrata* a été experimentée avec succès dans la nature. Les larves du Trématode *Riveiroia marini*, parasite à l'état adulte du rat, stérilisent le mollusque en se développant dans son ovotestis.

ECOLOGICAL EPIDEMIOLOGY OF *SCHISTOSOMA MANSONI* IN GUADELOUPE (FRENCH ANTILLES)

SUMMARY

In Guadeloupe, the snail *Biomphalaria glabrata* is, alone, the vector of *S. mansoni*. This snail is rather ubiquist but the parasite larvae develop only in restricted areas. The infection of *B. glabrata* is increased by some human activities. The rats are also contaminated, specially in the "fresh-water" mangroves. A new method for biological control of the snail was successfully experimented in the nature. The larvae of a Trematode, *Ribeiroia marini*, adult in the rat, sterilize *B. glabrata* as they have a part of their life-cycle in the ovotestis of the snail.

INTRODUCTION

En 1971, le Comité "Equilibres et lutte biologique" de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (D.G.R.S.T.) regroupait quatre projets de recherche en une seule action concertée qui se proposait d'étudier l'écologie des mollusques vecteurs de la schistosomose à *Schistosoma mansoni* aux Antilles françaises. Chemin faisant, des efforts par-

(*) Laboratoire de Pathologie et Epidémiologie Parasitaires, Faculté de Médecine de Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris Cédex 12

(**) Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences, 66000 Perpignan (France)

(***) Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire, 69005 Lyon (France)

(****) Laboratoire de Malacologie, E.P.H.E., Muséum d'Histoire Naturelle, 55 rue de Buffon, 75005 Paris

ticuliers seraient poursuivis pour découvrir des prédateurs ou des pathogènes permettant une lutte biologique contre le parasite et son hôte intermédiaire.

Les raisons de la mise en oeuvre de ce programme de recherches sont multiples mais peuvent se résumer en quelques points :

1) Sur le plan de la santé publique dans les zones tropicales, les Schistosomes sont un des problèmes majeurs. Elles sont en voie d'extension rapide car elles sont favorisées par la concentration humaine, la précarité de l'hygiène même élémentaire, la création de barrages sur les fleuves et les rivières avec extension des réseaux d'irrigation à ciel ouvert. Elles apparaissent comme une rançon de la mise en valeur des terres chaudes. Les statistiques récentes de l'O.M.S. indiquent un chiffre d'environ 300.000.000 de malades mais il est certain que les sujets exposés à une possible contamination sont infiniment plus nombreux et leur nombre doit dépasser les 600.000.000.

2) Actuellement, nous ne possédons aucune possibilité de traitement de masse. Les médicaments actifs sont efficaces mais ne peuvent être utilisés qu'individuellement et sous stricte surveillance, en raison de leur toxicité. Quant à la destruction des mollusques vecteurs par les composés dits "molluscocides", elle doit être considérée comme un pis-aller onéreux, dangereux pour toutes les biocenoses aquatiques, efficace à court terme dans une zone restreinte mais certainement pas comme le moyen-miracle de vaincre le fléau.

3) En matière de prophylaxie, les médiocres résultats obtenus jusqu'ici sont liés à l'ignorance dans laquelle nous sommes encore des conditions dans lesquelles le parasite et son ou ses vecteurs locaux vivent et se maintiennent dans la nature, en somme, à une méconnaissance de l'écologie de l'affection. L'action concertée, financée par la D.G.R.S.T. et, plus accessoirement, par d'autres organismes de recherche (C.N.R.S. et I.N.S.E.R.M.), était donc le premier projet mondial pour une enquête complète sur les conditions du fonctionnement d'un foyer naturel de Schistosomose humaine.

Le choix de la Guadeloupe avait été parfaitement réfléchi et les arguments favorables retenus furent les suivants :

- La Guadeloupe est un département français dont le statut est absolument identique à celui de n'importe quel département de la France métropolitaine. Ceci limitait donc les freins administratifs toujours à redouter dans ce type d'enquête.

- La Schistosomose à *S. mansoni* y sévit gravement. Nous avions connaissance des résultats d'enquêtes coprologiques ou sérologiques faites par divers auteurs et tous concordaient pour indiquer que, au moins dans certaines communes de l'île, la quasi-totalité de la population était contaminée.

- L'Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.) dispose en Guadeloupe d'un Centre de Recherche parfaitement équipé qui nous offrait une base logistique et un environnement scientiqique que nous n'eussions pas trouvé ailleurs.

- La Guadeloupe (ainsi qu'une mission préliminaire nous permettait de le pressentir) offre une mosaïque de biotopes très divers regroupés sur un espace restreint.

- Enfin, et c'est un point très important, en milieu insulaire il est plus facile de faire une analyse exhaustive des facteurs du milieu vivant et non-vivant, de contrôler une éventuelle campagne d'éradication et de suivre ses progrès. Il n'y a en effet guère de risques de voir la zone assainie recontaminée par sa périphérie comme cela est la règle sur une aire continentale.

PRESENTATION DE LA GUADELOUPE

Le département de la Guadeloupe comprend la Guadeloupe proprement dite et plusieurs autres petites îles qui, administrativement, en dépendent. Ces petites îles sont indemnes de Schistosomose, aussi notre tavail n'a-t-il porté que sur le "continent guadeloupéen". Celui-ci se compose, en fait, de deux îles accolées, la Grande Terre à l'est et la Basse Terre à l'ouest séparées par un étroit canal de marée, la Rivière Salée. La Grande Terre est une table de corail fossile basse et sèche (1,50 m de pluie par an environ) vouée à la culture de la canne à sucre pour la majeure partie de sa surface. La Basse Terre, au contraire, est une masse de roches volcaniques acides soulevées en une épine dorsale nord/sud qui culmine à 1.500 m à La Soufrière, volcan actif qui se dresse à l'extrémité sud de l'île. Cette chaîne de montagnes divise la Basse Terre en deux regions très distinctes quant à leur végétation et ceci est lié à la pluviosité qui est elle-même fonction du régime des vents. En effet, pratiquement toute l'année, souffle l'alizé qui vient du nord-est et s'est chargé d'humidité sur l'Atlantique. L'air saturé de vapeur d'eau vient butter contre la montagne, s'élève, se détend et se refroidit. La vapeur d'eau se condense et il pleut quotidiennement sur le versant est des monts. La Soufrière reçoit ainsi plus de 10 mètres d'eau par an ! Une fois franchie la ligne de crêtes, l'air redescend sur la pente de l'ouest, se comprime, se réchauffe et ce foehn chaud et sec explique que cette Côte-sous-le-vent soit peu arrosée (1,50 m d'eau par an en moyenne). De plus, elle est très à pic et plonge rapidement dans la mer des Caraïbes alors que le versant "au-vent" est en pente douce avec de larges piedmonts (fig. 1).

Tout l'axe montagneux est couvert par une dense forêt hygrophile. Lorsque les pentes sont plus accessibles, la forêt laisse place aux cultures de canne à sucre dans le nord-est, aux plantations de bananiers dans le sud. Quant à la Côte-sous-le-vent, elle se contente de maigres "jardins" péniblement gagnés sur une brousse arbustive (fig. 2).

De ce qui précède, il résulte que les collections d'eau douce sont de type très divers.

En Grande Terre, le karst de calcaire corallien soumis à l'érosion est creusé de dolines au fond colmaté par l'argile de décalcification. Ces dolines sont occupées par des mares permanentes ou temporaires, naturelles ou artificielles, dont les eaux servent aux usages domestiques et agricoles. Il existe une seule rivière permanente, la Ravine des Coudes, qui n'est, en fait, qu'un petit ruisseau réduit, en saison sèche, à un chapelet de flaques reliées par un mince filet d'eau.

Sur le versant humide de la Basse Terre, les cours d'eau sont des torrents soumis à des crues brutales et dévastatrices mais conservant toujours, même lors des étiages, un débit appréciable.

Sur la Côte-sous-le-vent, les torrent sont, au contraire, très souvent complètement à sec.

Il faut ajouter encore trois types de collections d'eau qui, nous le verrons, ont eu, au cours de notre travail, une très grande importance :

- Tout d'abord, les étangs forestiers du sud de la Basse Terre. Il s'agit de grandes mares, nées de l'activité volcanique, situées au milieu de la forêt de la pluie, à une altitude supérieure à celle des plus hautes cultures. La plus grande et la plus accessible est le Grand Etang.

- Le second type est constitué par un réseau de canaux qui dérivent une partie des eaux des torrents, surtout pour le fonctionnement des usines de traitement de la canne à sucre (rhum et sucre), le lavage des régimes de bananes mais aussi l'irrigation des jardins et les usages domestiques. Il faut en rapprocher les "canaux-égouts" des villes de Pointe-à-Pitre et de Basse Terre qui sont aussi souillés de façon surabondante.

- Enfin, sur les côtes de la Grande Terre et de la Basse Terre, protégées de l'agitation de la mer par la barre de corail vivant, se développe une mangrove qui se divise en deux parties, l'une où la forêt inondée pousse dans l'eau de mer et l'autre où les arbres caractéristiques *(Pterocarpus officinalis)* ombragent une vaste étendue d'eau parfaitement douce.

LE PROGRAMME INITIAL

Les premiers stades de la recherche furent programmés à la suite de la mission exploratoire faite en Guadeloupe en novembre 1971 par deux d'entre nous (Y.J.G. et Cl. C). Il fut décidé :

1) de faire l'inventaire de la faune malacologique dulçaquicole et de rechercher systématiquement les mollusques qui sont naturellement infestés par *S. mansoni* et ceux qui, expérimentalement, pouvaient héberger le parasite ;

2) d'analyser tous les facteurs vivants et non-vivants des divers milieux prospectés pour déterminer ceux qui interviennent dans la survie des larves du parasite dans les eaux, la présence et l'infestation du ou des vecteurs et de l'hôte définitif humain.

Il fallait, en particulier, mesurer en continu les paramètres chimiques et physiques dans les différents types de collections d'eau, recenser les espèces animales et végétales qui les habitent.

Après une phase de prospection intensive fut réalisée la cartographie précise des gites de mollusques et la repartition des points contaminés par *S. Mansoni* ;

3) de déterminer de façon systématique les organismes qui, par prédation ou action pathogène, sont capables de réduire les populations de mollusques vecteurs ou les populations du parasite. Pour notre part, nous avons fait porter l'essentiel de notre travail sur les helminthes dont les larves sont présentes chez les mollusques, dont les adultes se retrouvent chez l'homme, les animaux domestiques ou les animaux sauvages. Parallèlement, les virus, bactéries et champignons devaient être étudiés par le Laboratoire de Pathologie Comparée de C. Vago.

Pour mener à bien ce programme, près de 100 chercheurs et techniciens, appartenant non seulement aux quatre Laboratoires associés mais aussi à d'autres formations de recherches, surtout universitaires, ont travaillé pendant six ans. Au total, une masse considérable de données a été recueillie et commence d'être exploitée. Les sujets sont très divers et apportent une contribution dont il est difficile de mesurer encore l'importance à la biologie *sensu latissimo* de la Guadeloupe et, par extension, des Petites Antilles. La Parasitologie, la vie dans les eaux douces, saumâtres et marines, la Phytosociologie, l'Ethnologie, l'Ecologie et l'Ethologie de nombreuses espèces animales, la Modélisation mathématique ect., ont été surtout nos centres d'intérêt. Tout ceci s'est peu à peu mis en place et a pris plus ou moins d'importance au fur et à mesure de l'avancement du programme.

RESULTATS CONCERNANT LA SCHISTOSOMOSE

Ce sont les seuls dont nous parlerons ici et nous les résumerons en nous limitant à ceux qui sont d'ores et déjà bien établis.

1) Parmi tous les mollusques aquatiques recensés en Guadeloupe (J.P. Pointier, 1974 et 1976), le seul qui soit naturellement et expérimentalement le vecteur de *Schistosoma mansoni* est *Biomphalaria glabrata*. Tous les autres Planorbidae sont réfractaires.

2) Cependant, l'aire de répartition de la parasitose établie par les tests systématiques d'émissions cercariennes est bien plus restreinte que l'aire de répartition du mollusque vecteur.

3) Pour ce qui concerne *B. glabrata*, on peut dire que c'est un mollusque très ubiquiste qui occupe toutes les collections d'eau douce de la Guadeloupe, sauf peut-être celles où la teneur en sel dépasse 4 g pour 1.000 (c'est le cas des mares du sud-est de la Grande Terre, dans la région de Saint-François où il semble exister des infiltrations des eaux marines à travers le socle corallien).

4) Les activités humaines favorisent sa pullulation. La pollution organique des eaux douces par les eaux usées domestiques ou industrielles (usines de traitement de la canne pour la fabrication du sucre et du rhum, lavage des régimes de bananes), l'utilisation de pesticides agricoles qui tuent les prédateurs de mollusques, d'engrais qui augmentent la croissance des algues dont *B. glabrata* se nourrit sont des facteurs majeurs pour expliquer la densité du mollusque dans certaines eaux. Il faut y ajouter aussi le mauvais entretien des canaux artifi-

ciels, tant ceux à usage industriel que ceux à usages domestique ou agricole : les fuites, l'encombrement du cours par la vase et les végétaux sont autant d'éléments propices non seulement à la pullulation du mollusque mais aussi à celle du parasite qu'il héberge.

5) Cependant *B. glabrata*, outre *S. mansoni*, héberge et assure le développement de plusieurs autres Trématodes qui, à l'état adulte, parasitent des vertébrés. Parmi ces Trématodes, quatre au moins diminuent, voire suppriment entièrement la ponte du mollusque. Les mécanismes varient d'ailleurs selon le Trématode en cause, la stérilité peut être soit temporaire soit définitive. Quoiqu'il en soit ces parasites, lorsqu'ils furent découverts, nous permirent d'espérer les utiliser comme moyen de lutte biologique à la fois spécifique et peu onéreux. Très rapidement, un seul de ces parasites s'avéra intéressant de ce point de vue : *Ribeiroia marini*. Schématiquement, son cycle est le suivant : l'adulte vit fixé à la muqueuse gastrique du rat, les oeufs sont dispersés dans la nature par les crottes. Ceux qui tombent dans l'eau eclosent et donnent des larves qui pénètrent chez *B. glabrata*. Les différents stades larvaires se succèdent et les rédies qui se développent dans l'ovotestis détruisent les cellules de la glande génitale du mollusque. Les cercaires s'échappent dans l'eau, s'enkystent chez des poissons (ici, le plus souvent le Cichlidé introduit *Tilapia mossambica*). Le rat se contamine en dévorant les poissons morts. La stérilisation du mollusque est pratiquement définitive, la reprise du fonctionnement de la gonade après élimination du parasite est exceptionnelle et, de toute façon, peu productive. Il est facile d'élever des rats contaminés et donc d'obtenir une grande quantité d'oeufs de *R. marini*. Il suffit de les disperser dans une collection d'eau abritant *B. glabrata* pour obtenir la disparition quasi-totale du mollusque. L'essai a été fait en vraie grandeur en Guadeloupe et les résultats exposés par ailleurs dans les travaux de J.P. Pointier et H. Nassi indiquent qu'il a été inclurant.

6) La découverte de *B. glabrata* porteur de *S. mansoni* au Grand Etang, grande mare forestière peu fréquentée par l'homme, hormis quelques chasseurs, pêcheurs ou promeneurs, le fait que c'est chez les rats qui hantent cet étang que nous avons trouvé *R. marini* ont posé immédiatement une question qui devait être résolue en priorité : l'homme est-il le seul mammifère contaminé par *S. mansoni* en Guadeloupe ?

La réponse est formelle : en dehors de l'homme, les rats, qu'il s'agisse de *Rattus rattus* ou de *R. norvegicus*, qu'ils soient rats domestiques, rats urbains, rats des champs ou des forêts sont lourdement contaminés par *S. mansoni* et contribuent, sans aucun doute, au maintien de l'endémie schistosomienne. Sur le plan de lutte contre la maladie, l'existence de ce "réservoir de virus" animal vient compliquer singulièrement le problème à résoudre. En revanche, cette souche guadeloupéenne adaptée au rat est intéressante sur le plan des Laboratoires de recherche puisqu'elle permet, pour la première fois, de disposer d'un animal de bonne taille, très réceptif et facile à garder en laboratoire.

7) La prospection systématique de la schistosomose chez le rat nous fit bientôt découvrir une autre zone lourdement contaminée et qui, jusqu'alors, était méconnue. Il s'agit de la mangrove douce (ou mangrove palustre). Les rats *(R. rattus)* y sont très abondants et pratiquement tous porteurs d'infestations massives par *S. mansoni*. Or, cette mangrove douce est très fréquentée par l'homme. Les enfants y vont, en certaines saisons, piéger des crabes, les

riverains y cultivent, au moins à la lisière, des *Colocasia* (madère et malangas, Aracées à racines comestibles) et font paître leur bétail dans les prairies inondables qui séparent la mangrove des champs de canne à sucre.

Actuellement, des études de morphologie fine sont en cours pour tenter de savoir s'il existe des éléments permettant de différencier les larves infestantes de *S. mansoni* selon que l'adulte qui les a produites parasitait un homme ou un rat. Pour autant que l'on puisse le savoir, l'hôte définitif semble agir comme un filtre écologique qui sélectionne dans la population de larves telle ou telle fraction. Il reste à savoir si, après plusieurs générations, le retour à l'hôte original est possible ou s'il y a ségrégation définitive en souche humaine et souche murine.

CONCLUSIONS

En Guadeloupe, la Schistosomose humaine résulte de la présence de *B. glabrata* et de lui seul. Le mollusque est favorisé par diverses activités humaines qui éliminent ses facteurs limitants et augmentent la capacité du milieu à nourrir des populations très denses du mollusque. La maladie sévit :

1. au nord-est de la Basse Terre, dans la zone de culture de canne à sucre ;
2. au sud de la Basse Terre, dans la zone de culture de la banane ;
3. dans les agglomérations ;
4. dans la frange des mangroves douces où le rat est lourdement contaminé (fig. 3).

Bien que *B. glabrata* existe dans les mares de la Grande Terre et dans la Ravine des Coudes, il n'est pas contaminé. Ceci s'explique par le décalage qui existe entre la grande tolérance thermique du mollusque et la faible tolérance thermique du parasite.

En divers points contaminés, la densité des larves infestantes est considérable puisque les techniques de filtration/comptage sur le terrain ont permis de trouver des densités QUI DEPASSENT 300 CERCAIRES PAR LITRE D'EAU. On conçoit, dès lors, qu'un sujet neuf puisse être lourdement contaminé à la suite d'un seul bain en eau polluée !

La mise au point du modèle mathématique, actuellement en cours, va permettre de rendre compte du fonctionnement réel du foyer de Schistosomose de la Guadeloupe, d'apprécier les divers facteurs qui interviennent dans ce fonctionnement. Le comportement de l'homme, en particulier son attitude vis-à-vis des eaux douces, sa conception de la "maladie schistosomienne", la dynamique des populations du *B. glabrata*, du *Schistosoma mansoni* et des rats contaminés ont été étudiés et nous ont fourni des données chiffrées.

Au terme de ces années de travail permanent, on peut conclure que l'éradication de la Schistosomose dans l'île est à la fois facile théoriquement et difficile à faire entrer dans les faits. La lutte doit être menée conjointement avec tous les moyens dont nous dispo-

sons. La contamination humaine se fait en des points très précis, à des moments très déterminés. La lutte doit donc être faite dans ces zones parfaitement répertoriées. Parallèlement, l'Education sanitaire, les travaux de Génie rural et d'Assainissement doivent être menés avec persévérance. Une telle campagne intégrée d'éradication ne peut être couronnée de succès que si elle est prise en main par un organisme coordinateur responsable et doté de moyens financiers et légaux indispensables. La lutte biologique, pas plus que n'importe quelle autre méthode, ne saurait, à elle seule, avoir d'effets sensibles.

Ce qu'il importe de faire disparaître de la Guadeloupe, c'est *Schistosoma mansoni* et lui seul. Le prix à payer est peut-être important mais il est infiniment moins élevé que celui de mesures parcellaires, prises de façon anarchique par diverses instances mal informees et peu responsables, car il est impossible qu'elles aboutissent à autre chose qu'à des échecs répétés. En matière de Prophylaxie des grandes endémies, le choix d'exemples démonstratifs est, de ce point de vue et malheureusement, trop facile.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

POINTIER J.P., 1974. - Faune malacologique dulçaquicole de l'île de la Guadeloupe (Antilles françaises). *Bull. Mus. Hist. Nat. Paris, sér. Zool., 159* : 905-933.

POINTIER J.P., 1976. - Répartition locale et biogéographie des mollusques dulçaquicoles de l'île de la Guadeloupe (Antilles françaises). *Malac. Rev., 9* : 85-103.

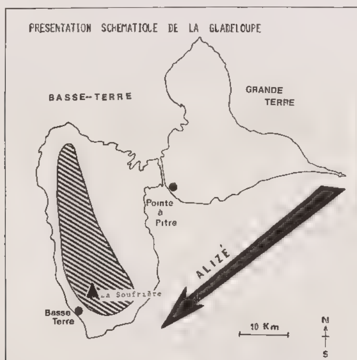


Fig. 1

REPARTITION SCHEMATIQUE DES ZONES DE VEGETATION EN GUADELOUPE

CULTURES MARAICHERES

CANNE A SUCRE

BANANES

MANGROVE

SAVANES ET FRICHES

FORÊT

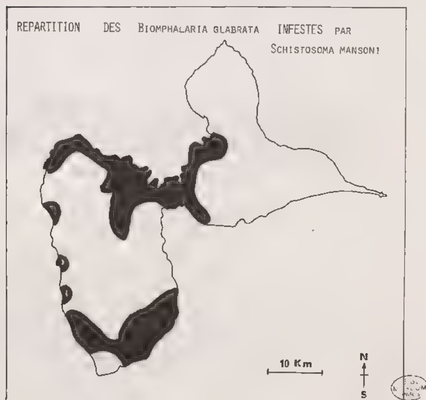


Fig. 2 et 3

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 137 à 140

ESSAI D'INTERVENTION SUR UNE POPULATION DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* DE GUADELOUPE A L'AIDE D'UN TREMATODE STERILISANT : DYNAMIQUE DE LA POPULATION DU MOLLUSQUE

par Jean-Pierre Pointier (*), Henri Nassi (**) et André Delplanque (***)

RESUME

Un essai d'intervention sur une population de *Biomphalaria glabrata* à l'aide d'un Trématode stérilisant *Ribeiroia marini* a débuté en septembre 1976 dans une mare de Guadeloupe. L'introduction d'oeufs du parasite pendant 10 mois s'est accompagnée d'un déclin de la population de *B. glabrata* beaucoup plus rapide que celui des années précédentes.

A CONTROL ATTEMPT OF A POPULATION OF *BIOMPHALAIRA GLABRATA* IN GUADELOUPE USING A STERILIZING TREMATODE : DYNAMIC OF THE SNAIL POPULATIONS

SUMMARY

Biological assay of *Biomphalaria glabrata* using the sterilizing Trematode *Ribeiroia marini* was tested in a pond of Guadeloupe after septembre 1976. Eggs of parasite have been introduced in the pond for ten months and the population of *B. glabrata* has declined more rapidly than the preceding years.

INTRODUCTION

Le présent travail résume les premiers résultats qui ont été observés de septembre 1976 à juin 1977, sur un essai d'intervention sur une population naturelle de *Biomphalaria glabrata*, vecteur de *Schistosoma mansoni* en Guadeloupe. L'intervention a été faite à l'aide d'un Trématode qui se développe chez ce Mollusque et provoque sa castration (Golvan et al., 1974).

(*) Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Biologie Marine et de Malacologie, 55 rue de Buffon, 75005 Paris

(**) Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, Avenue de Villeneuve, 66025 Perpignan Cédex (France)

(***) Centre de Recherches Forestières, Station de Zoologie I.N.R.A., Ardon, 45161 Olivet (France)

METHODES

Une mare de Grande Terre (à Céligny) a été choisie comme site d'intervention. Les raisons qui ont guidé ce choix sont les suivantes :

1) Présence d'un cycle annuel de reproduction bien marquée pour *B. glabrata* en relation avec l'alternance saison sèche, saison des pluies.

2) Possession de données quantitatives sur l'évolution de différents paramètres de la mare au cours des années 1974-1975 (Pointier et al., 1977).

La mare de Céligny est typique d'une région de Grande Terre qu'on appelle les Grands Fonds. Tous les ans, en été, la mare s'assèche presque totalement. La remise en eau a lieu d'août à novembre et permet alors le renouvellement complet des populations malacologiques. L'introduction des oeufs de parasite a débuté en septembre 1976, soit un mois avant l'apparition des nouvelles générations de *B. glabrata*.

Conjointement à cette introduction du parasite, la dynamique de la population de *B. glabrata* a été suivie selon un rythme bimensuel. Des prélèvements de 1/10 de m^2 sont effectués à l'aide d'un cylindre en tôle dans chacune des différentes strates végétales (cf. Pointier et al., 1977, fig. 2, p. 282). La précision de la méthode a été évaluée par comparaison avec une méthode de capture, marquage et recapture. L'erreur est inférieure à 24 %. Cette erreur, cependant, n'est valable que pour les Mollusques de taille supérieure à 4 mm car notre technique d'échantillonnage ne permet pas de récolter les nouveau-nés (< 1 mm) et, d'autre part, sous-estime les juvéniles (1 à 3 mm). Sur le graphique (fig. 2) ne seront donc représentées que les classes $\geqslant$ 3 mm.

L'estimation des taux de ponte de *B. glabrata* a été réalisée par une méthode d'élevage *in situ* dans des cages et a été complétée par un comptage des pontes sous les feuilles de Nénuphars.

La croissance de *B. glabrata* a été estimée de deux manières :

1) par la méthode des cohortes,

b) par une méthode d'élevage *in situ* dans des cages (Lévêque et Pointier, 1976).

RESULTATS

L'évolution de la surface de la mare jusqu'en février 1977 a été similaire à celle de la période 1974-1975 (fig. 1 en haut). Puis, à partir de février 1977, l'assèchement a été plus rapide, à tel point que la mare s'est trouvée à son plus bas niveau un mois et demi à deux mois en avance par rapport aux années précédentes. Ce phénomène s'explique par le fait qu'il n'y a pratiquement pas eu de "petite saison des pluies" en 1977 (quelques jours de pluie entre le 18.04 et le 2.05.1977), alors qu'en 1975 l'intersaison avait été très pluvieuse de février à avril.

La population de *B. glabrata* a atteint sa densité maximale en octobre 1977. Puis, la population décline, d'abord très rapidement et ensuite plus lentement, pour disparaître complètement au mois de juin (fig. 1, en bas). La mare est alors à un niveau très bas mais n'est pas complètement asséchée.

L'évolution démographique de la population de Mollusques est marquée par une courte période de très forte ponte après la remise en eau de la mare (fig. 2 en bas). Les premiers jeunes apparaissent dans les prélèvement le 27.09.1076, puis massivement à partir d'octobre (fig. 2 en haut). L'évolution de cette cohorte de jeunes nous a permis de tracer une courbe de croissance. La comparaison avec la courbe obtenue en 1974-1975 montre que la croissance a été plus lente en 1976-1977 mais que les tailles maximum atteintes ont été similaires (fig. 3 en haut). Par ailleurs, deux autres courbes de croissance obtenues en octobre 1976 (saison des pluies) et en février 1977 (saison sèche) par une méthode d'élevage *in situ* dans des cages, sont très voisines (fig. 3 en bas). Il semble donc que les conditions de croissance aient peu varié de septembre 1976 à mars 1977. Apparemment, la présence du parasite n'a pas empêché la principale cohorte de Mollusques de se développer normalement puisque les densités maximales de Mollusques atteintes en octobre 1976 ont été voisines de celles atteintes en 1974. Par contre, le déclin de la population de *B. glabrata* a été plus fort en 1977 qu'en 1975 et le Mollusque a même totalement disparu lorsque la mare a atteint son niveau le plus bas. Ce phénomène ne s'était pas produit au plus fort de la saison sèche en 1975 ni même en 1976, d'après quelques observations ponctuelles. Par ailleurs, en ce qui concerne le nombre de pontes observées par comptage sous les feuilles de Nénuphar, on constate que, pour la période de mars à avril 1977, le nombre moyen d'oeufs rapporté par Planorbe et par m^2 de feuilles de Nénuphar est de 1,09 alors que ce nombre était de 2,08 pour la période de mars à avril 1975. L'apport de jeunes au cours de cette période a donc été beaucoup plus faible en 1977 qu'en 1975, ce qui peut expliquer que le déclin des populations ait été beaucoup plus brutal et qu'on ait même assisté à une disparition totale des Mollusques avant l'assèchement complet de la mare.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GOLVAN Y.J., COMBES C., BAYSSADE-DUFOUR C. et NASSI H., 1974. - Les cercaires de *Ribeiroia marini* (Faust et Hoffman, 1934), Trématode antagoniste de *Schistosoma mansoni* et provoquant la castration du Mollusque-hôte, vecteur de la bilharziose humaine. *C.R. Acad. Sci. Paris*, sér. D, *279* : 405-408.

LEVEQUE C. et POINTIER J.P., 1976. - Study of the growth of *Biomphalaria glabrata* (Say) and other *Planorbidae* in Guadeloupe (West Indies). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, *70* (2) : 199-204.

POINTIER J.P., SALVAT B., GOLVAN Y.J. et DELPLANQUE A., 1977. - Principaux facteurs régissant les populations de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), Mollusque vecteur de la Schistosomose en Guadeloupe (Antilles françaises). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, *52* (3) : 277-323.

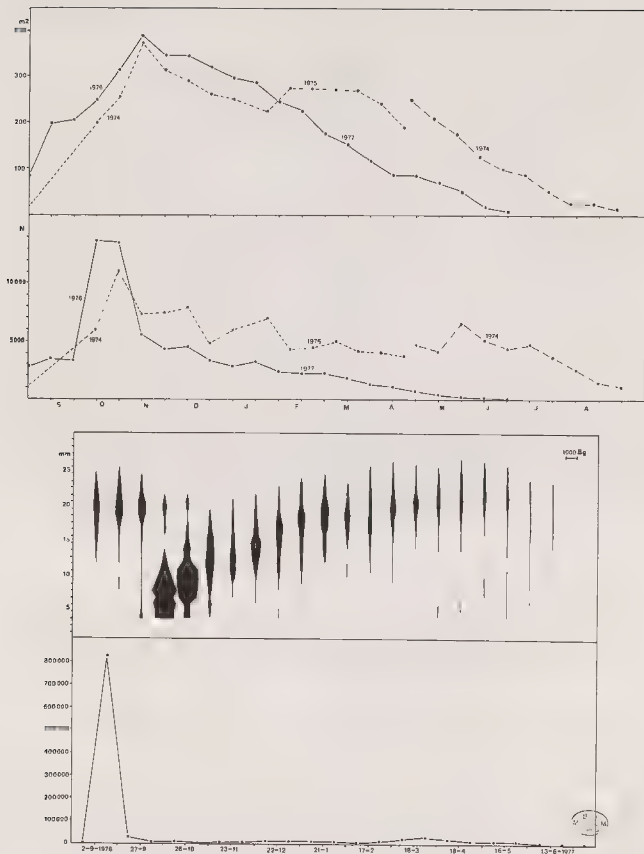

m2
300
200
100
1976
1974
1975
1977
1974
N
10000
5000
1976
1974
1975
1977
1974
S
O
N
D
J
F
M
A
M
J
J
A
mm
25
20
15
10
5
1000 Bg
800000
700000
600000
400000
300000
200000
100000
0
2-9-1976
27-9
26-10
23-11
22-12
21-1
17-2
18-3
18-4
16-5
13-6-1977

Figure 1 ET 2

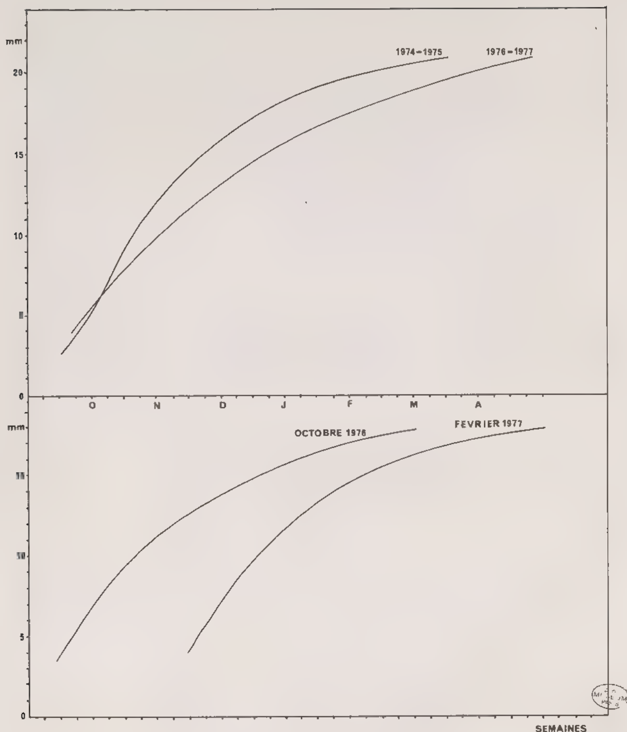


Fig. 3

LEGENDE DES FIGURES

Fig. 1. - En haut : Evolution de la surface de la mare.

En bas : Evolution du nombre de Biomphalaria glabrata dans la mare.

Fig. 2. - En haut : Evolution des classes de taille de Biomphalaria glabrata.

En bas : Evolution du nombre d'oeufs de Biomphalaria glabrata.

Fig. 3. - En haut : Courbes de croissance de Biomphalaria glabrata (méthode des cohortes).

En bas : Courbes de croissance de Biomphalaria glabrata (méthode d'élevage in situ dans des cages).

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 143 à 146

ESSAI D'INTERVENTION SUR UNE POPULATION DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* DE GUADELOUPE A L'AIDE D'UN TREMATODE STERILISANT : EVOLUTION DE LA PREVALENCE

par Henry Nassi (*), Jean-Pierre Pointier (**), Yves J. Golvan (***) et Simone Seytor (****)

RESUME

Des oeufs de *Ribeiroia marini guadeloupensis* ont été introduits en grande quantité dans une mare de Guadeloupe de septembre 1976 à juillet 1977. 40 % de la population jeune de *Biomphalaria flabrata* vivant dans cette mare a été infestée. Puis la prévalence est restée stable pendant 7 mois. Il n'a été possible d'atteindre une forte prévalence (90 %) dans la population âgée que le dernier mois de l'essai alors que la mare était en train de s'assécher.

CONTROL ATTEMPT OF A POPULATION OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* IN GUADELOUPE USING A STERILIZING TREMATODE : EVOLUTION OF THE PREVALENCE

SUMMARY

Eggs of *Ribeiroia marini guadeloupensis* have been introduced in large quantities in a pond of Guadeloupe from september 1976 to july 1977. 40 % of the young population of *Biomphalaria glabrata* living in this pond become infected. Then the prevalence remained stable for seven months. It was possible to achieve a very high prevalence (90 %) in the old snail population only during the last month of the attempt as the pond was drying up.

INTRODUCTION

En Guadeloupe, le deuxième hôte intermédiaire de *Ribeiroia marini guadeloupensis* est un Poisson et les hôtes définitifs sont *Rattus rattus* et *R. norvegicus* (Combes et al., 1975 ;

(*) Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, Avenue de Villeneuve, 66025 Perpignan Cédex (France)

(**) Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Biologie Marine et Malacologie, 55 rue de Buffon, 75005 Paris

(***) Laboratoire de Parasitologie, C.H.U. Saint Antoine, 27 rue de Chaligny, 75571 Paris Cédex 12.

(****) Hôpital de Pointe à Pitre, 97110 Pointe à Pitre (Guadeloupe)

Nassi, sous presse). Parmi les Trématodes dont les formes larvaires stérilisent *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe (Galvan et al. 1975), *R. marini* est la seule espèce dont le cycle puisse être entretenu sur un animal de laboratoire classique, le Rat albinos. Ce facteur a été déterminant dans le choix de cette espèce pour un essai d'intervention, d'autant que l'élevage et l'infestation de l'un des deuxièmes hôtes intermédiaires naturels, le Poisson Cichlidae *Tilapia mossambica*, ne pose pas de problèmes majeurs.

MATERIEL ET METHODES

L'un d'entre nous rapporte par ailleurs dans le détail l'ensemble des manipulations necessaires à la production d'oeufs en grande quantité (Nassi, sous presse). Deux lots de 10 Rats ont été utilisés successivement, le premier pendant 6 mois (septembre - février), le second jusqi'à l'assèchement de la mare (février - juillet). La production quotidienne d'oeufs qui est de 30.000 pendant le premier mois diminue régulièrement avec le temps ; elle tombe à 15.000 à la fin du troisième mois et n'est plus que de 5.000 à la fin du sixième mois. Tous les oeufs produits ont été déversés dans la mare. L'évolution de la prévalence est suivie en prélevant tous les 15 jours un échantillon de 100 à 250 Mollusques qui sont testés pendant 24 heures avant d'être replacés dans la mare. Seules les infestations patentes sont ainsi décelées.

RESULTATS

L'introduction des oeufs de *R. marini* commence environ un mois avant le début de l'explosion démographique qui accompagne la remise en eau de la mare. Les premières émissions de cercaires sont observées 37 jours après la première introduction, la prévalence atteignant alors 6,2 % (fig. 1). Compte tenu des résultats expérimentaux, ces 37 jours représentent un délai minimum ; en effet, au laboratoire, dans des conditions de température proches de celles généralement relevées à cette époque dans la mare (Pointier et al., 1977), l'incubation des oeufs dure au minimum 8 jours et la période prépatente chez le Mollusque 4 semaines (Nassi, sous presse).

Dix semaines après le début de l'expérience, la prévalence atteint 40 %. L'augmentation de la prévalence entre la 8ème et la 10ème semaine s'accompagne d'un important déclin de la population, déclin beaucoup plus accusé que celui qui marque la même période pendant l'année temoin. Le parasite apparaît donc capable de se comporter comme un agent pathogène efficace vis-à-vis d'une population jeune de Mollusques.

Dès la 8ème semaine, la parasitose affecte pratiquement toutes les classes de taille de la popularion (fig. 2). Ce schéma se maintient pendant toute la durée de l'expérience.

La prévalence a tendance par la suite à se stabiliser. Elle ne dépasse 50 % qu'à deux reprises (22ème et 24ème semaine). Parmi les facteurs à l'origine de cette stabilisation figure le vieillissement de la population avec comme corollaire une réceptivité au parasite

très diminuée. Une plus forte mortalité des Mollusques infestés pourrait également concourir à cette stérilisation. La baisse de la productivité des oeufs du premier lot de Rats ne semble pas intervenir. Après le renouvellement des Rats parasités, la prévalence va encore se maintenir pendant 12 semaines à des valeurs inférieures à 50 %, alors qu'on aurait pu s'attendre à son augmentation dans un délai comparable au délai d'apparition des premières émissions cercariennes (37 jours).

L'équilibre entre la population de Planorbes et le parasite est brusquement rompu dans la période qui précède l'assèchement de la mare. Entre la 38ème et la 41ème semaine, la prévalence passe de 48 % à 90 %. Expérimentalement, il est possible de parasiter des Mollusques âgés à condition de les exposer à de nombreux miracidiums. L'assèchement de la mare reproduit ces conditions expérimentales ; il permet d'atteindre un seuil critique de concentration en miracidiums, seuil au-delà duquel le parasite s'avère capable d'infester les Mollusques de tous âges.

CONCLUSION

La première phase de l'évolution de la prévalence, caractérisée par une forte incidence, atteste de la réceptivité de la population jeune. Celle-ci a pu être parasitée à 40 % malgré, d'une part l'utilisation d'un nombre limité de Rats parasités et, d'autre part, l'importance de l'explosion démographique. Par la suite, ce n'est que durant la période qui précède l'assèchement de la mare que le parasite manifeste son efficacité sur la population âgée. Celle-ci aborde la saison sèche stérilisée à 90 %.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

COMBES C., LEGER N. et GOLVAN Y.J., 1975. - Rats et bilharziose en Guadeloupe. *Acta Trop., 32* : (4) : 304-308.

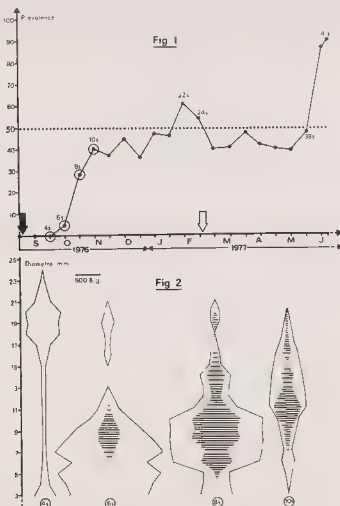
GOLVAN Y.J., COMBES C. et NASSI H., 1975. - Castration du Mollusque *Biomphalaria glabrata* par les larves de divers Trématodes guadeloupéens. *C.R. Acad. Sci. Paris*, sér. D, *280* : 1607-1610.

NASSI, H., 1979. - Données sur le cycle biologique de *Ribeiroia marini guadeloupensis* n. ssp., Trématode stérilisant *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe. Entretien du cycle en vue d'un contrôle éventuel des populations de Mollusques. *Acta Trop.* (sous presse).

LEGENDE DES FIGURES

Fig. 1 - Evolution de la prévalence.
Flèche noire : début de l'introduction des oeufs de *R. marini*
Flèche évidée : renouvellement des Rats parasités.
La structure de la population est donnée pour les points cerclés dans la Fig. 2.

Fig. 2 - Répartition par classe de taille des Mollusques émettant des cercaires (hachures) lors des trois premiers échantillonnages positifs (6ème, 8ème et 10ème semaine). La structure de la population est également donnée pour la 4ème semaine. Noter le déclin de la population entre la 8ème et la 10ème semaine.



Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 147 à 149

RECHERCHES SUR LA PRODUCTION DES CERCAIRES DE *SCHISTOSOMA MANSONI* PAR DES *BIOMPHALARIA GLABRATA* DE GUADELOUPE ET DU BRESIL

par André Théron (*)

RESUME

La production cercarienne du couple *S. mansoni* – *B. glabrata* est différente suivant l'origine géographique de la souche. Le couple guadeloupéen est trois fois plus productif que le couple brésilien. Tant pout la souche de Guadeloupe que pour celle du Brésil, la production cercarienne est caractérisée par des vagues successives de fortes émissions qui pourraient être en relation avec le développement larvaire intramolluscal.

RESEARCH ON CERCARIAL PRODUCTION OF *S. MANSONI* BY *B. GLABRATA* FROM GUADELOUPE AND BRAZIL

SUMMARY

Cercarial production of the host-parasite combination *(S. mansoni* – *B. glabrata)* differs with the geographical origin of the strain. The guadeloupean combination is three times more productive than the brazillian-one. For both strains, cercarial production is characterized by successive weaves of high emission. This could be related to larval development in the snail.

Des *Biomphalaria glabrata* de Guadeloupe et du Brésil sont respectivement infestés avec 5 miracidiums de *Schistosoma mansoni* d'origine guadeloupéenne et brésilienne. Les mollusques sont maintenus à la température de 26°C et sous une photopériode L D : 12-12. Les cercaires sont comptés tous les jours, une heure après le début de la scotophase. Nous avons étudié la production cercarienne de 8 *B. glabrata* de Guadeloupe et de 11 *B. glabrata* du Brésil.

La durée de la période prépatente à 26°C est équivalente dans les deux groupes de mollusques : 28 – 32 jours pour les *B. glabrata* du Brésil, 30 – 32 jours pour ceux de Guadeloupe. Les résultats concernant la production journalière par mollusque sont représentés sur la figure 1. La comparaison des deux courbes de production cercarienne fait apparaître une importante différence entre le nombre des cercaires émises par les mollusques brésiliens et les mollusques guadeloupéens. Pour le Brésil, la production journalière moyenne et par jour est

(*) Département de Biologie animale, Université, 66025 Perpignan (France)

de 232 cercaires, calculée sur 60 jours de production, alors qu'elle atteint 660 cercaires par jour et par mollusque pour la souche de Guadeloupe. Les productions maximales observées sont de 760 cercaires pour le Bresil et 1830 cercaires pour la Guadeloupe.

Sur le plan qualitatif, l'évolution de la production cercarienne en fonction du temps est très voisine pour les deux souches étudiées. Les deux courbes présentent deux périodes de fortes émissions séparées par une période de plus faibles émissions cercariennes. Pour le couple hôte-parasite du Brésil, la première période de forte production se situe entre le 30ème et le 40ème jour post-infestation, entre le 30ème et le 58ème pour le couple de Guadeloupe. La période de faible production est plus longue chez les mollusques du Brésil (entre le 40ème et le 55ème jour) que chez ceux de Guadeloupe (entre le 58ème et le 62ème jour). La deuxième période de production est, dans les deux cas, plus importante que la première. Le maximum des cercaires émises se situe au 66ème jour pour le Brésil et au 76ème jour pour la Guadeloupe.

Dans nos deux expériences, le dernier mollusque est mort au 81ème jour pour le Brésil, au 97ème jour pour la Guadeloupe. Cependant, ces durées de production ne peuvent être considérées comme caractéristiques du couple hôte-parasite. En effet, on observe fréquemment des périodes d'émission plus longues, de l'ordre de 7 à 8 mois. Il est fort probable que cette alternance de fortes et de faibles périodes de production doit se répéter régulièrement au cours des longues infestations (Mougeot et Golvan, 1974 ; Golvan et al., 1975).

Dans la dynamique de la transmission des schistosomes, la phase de production cercarienne joue un rôle important puisque du nombre des cercaires produites dépendront les densités cercariennes responsables de la contamination du Vertébré. Il est donc intéressant de déterminer un indice de productivité cercarienne caractérisant le système hôte-parasite considéré. Nos résultats montrent que, pour un même couple *S. mansoni* – *B. glabrata*, cet indice peut être extrêmement différent suivant l'origine géographique. La souche guadeloupéenne est trois fois plus productive que la souche brésilienne.

Nous pensons que l'alternance des périodes de forte et faible production également observée chez *S. mansoni* – *B. glabrata* d'Afrique du Sud (Pitchford et al., 1969) pourrait être interprétée comme la manifestation extérieure de mécanismes de régulation ou de renouvellement des populations larvaires intravectorielles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

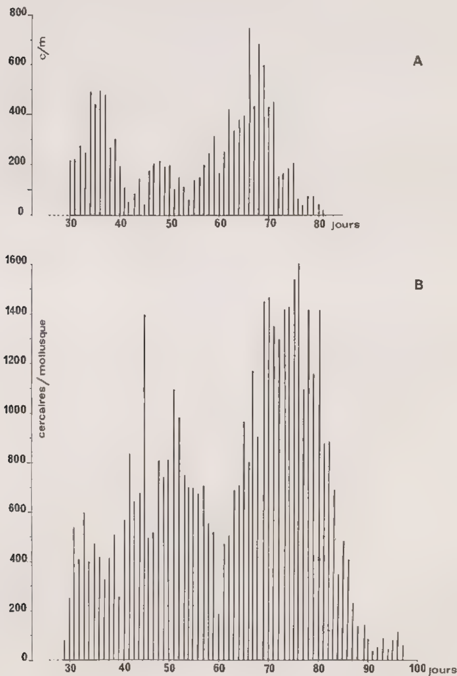
GOLVAN Y.J., LANCASTRE F., BARRIERE L., DEROUIN F. et TRENEY-BOLOGNINI J., 1975. – Schistosomose expérimentale. I. Etude de la fécondité de *Schistosoma mansoni* en fonction de son adaptation à la souche de *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, *50* (5) : 617-628.

MOLGEOT G. et GOLVAN Y.J., 1974. - Etude des relations entre la longévité de *Biomphalaria glabrata* et son infestation par *Schistosoma mansoni* (Etude de la variation quantitative de l'émission des furcocercaires). *Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comp., Lyon*, 76 : 119-124.

PITCHFORD R.J., MEYLING A.H., MEYLING J. et DU TOIT J.F., 1969. - Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 63 (3) : 359-371.

LEGENDE DES FIGURES

Fig. 1 - Courbes de production des cercaires de *S. mansoni* par des *B. glabrata* infestés par 5 miracidiums : A - souche brésilienne ; B - souche guadeloupéenne.



Haliotis, 8, 1977.
p 151 à 155

INFLUENCE DE TEMPERATURES CONSTANTES ET DE TEMPERATURES VARIABLES SUR LA PREPATENCE DE *SCHISTOSOMA MANSONI* ET SUR L'HOTE INTERMEDIAIRE *BIOMPHALARIA GLABRATA*

par Wolfgang Pflüger(*)

RESUME

La longueur de la période de prépatence de *S. mansoni* chez *B. glabrata* (souche albino) à température constante entre 16 et 33°C est reflétée approximativement par l'hyperbole y = 268/(X-14,2). Le point zéro théorique du développement se situe autour de 14,2°C, la durée minimale du développement est de 15 jours à 32°C. La production du cercaire est retardée à 34 et 35°C mais les cercaires, rares et petits, sont infectieux.

La croissance maximale des animaux est observée entre 25 et 28°C. La suppression du développement et de la ponte à températures élevées (34 et 35°C) est réversible.

Des températures plus élevées (28°C à une température de base de 19°C) à différentes sections de la période de prépatence abrègent le temps total du développement proportionnellement à leur durée. La somme des températures permet de calculer exactement la période de prépatence.

Une variation journalière (amplitude 10°C) de température produit des périodes de prépatence correspondant à la température principale. L'inversion de la photopériode n'a pas d'influence.

THE INFLUENCE OF CONSTANT AND ALTERNATING TEMPERATURES ON THE TIME OF DEVELOPMENT OF *SCHISTOSOMA MANSONI* IN THE INTERMEDIATE HOST SNAIL *BIOMPHALARIA GLABRATA*

SUMMARY

The lenght of the prepatency period of *S. mansoni* in *B. glabrata* (Albino strain) at constant temperatures between 16 and 33°C can be described approximately by means of a hyperbola y = 268/(x-1 4,2). The theoretical "threshold of development" is about 14,2°C, the minimum time of development is 15 days (at 32°C). The production of cercariae at 34 and 35°C is retarded, but the few and small cercariae are still infective.

The maximum growth rate of the snails is observed between 25 and 28°C. Suppression of growth and egg laying at high temperatures (34 and 35°C) is reversible.

Higher temperatures (e.g. 28°C, at a basic temperature of 19°C) at different sections of the prepatency period shorten the total time of development in proportion to their duration. The "sum of temperatures" permits to calculate exactly the prepatency period.

Diurnally fluctuating temperatures (amplitude 10°C) result in prepatency periods corresponding to the mean temperature. Inversion of the photoperiod had no influence.

(*) Institut für Medizinische Parasitologie, D 5300 Bonn-Venusberg (Allemagne Fédérale)

Certaines souches de *Biomphalaria* ne tolèrent pas bien les hautes températures tropicales. Ainsi, les *B. pfeifferi*, hôtes intermédiaires de *Schistosoma mansoni* dans de grandes parties d'Afrique australe et de Madagascar, où ils préfèrent les eaux des hauts-plateaux. Dans ces régions, on observe souvent de basses températures en saison froide, qui ralentissent ou même arrêtent le développement d'éventuelles infestations de *S. mansoni* (Pitchford Visser, 1965 ; Shiff et al., 1975 ; Pflüger, 1976). Les conséquences pour la transmission de la bilharziose peuvent être considérables.

La durée de développement de *S. mansoni* (souche d'origine ouest-africaine) dans *Biomphalaria glabrata* (souche Albinos) a été déterminée pour des températures constantes entre 16 et 35°C. On obtient un rapport qui peut être décrit approximativement à l'aide d'une fonction hyperbolique prenant la forme $y = 268/(x-14,2)$, y étant la durée minimale de prépatence en jours et x la température en °C (v. figure). Les valeurs des souches que nous avons utilisées ne diffèrent pas essentiellement de celles qui ont été partiellement déterminées pour des souches africaines et malgaches (Foster, 1964 ; Pflüger, en préparation). Le "point zéro théorique" du développement se situe autour de 14,2°C, $x-14,2$ serait la température "biologiquement effective". La durée minimale de prépatence est de 15 jours (à 32°C). Le développement peut être retardé à 34 et 35°C où on approche de la limite de tolérance des mollusques, avec une mortalité très élevée ; les cercaires sont peu nombreuses et relativement petites, mais encore capables d'infester des souris.

Pour notre souche de *B. glabrata*, la croissance maximale se situait entre 25 et 28°C. L'arrêt de croissance et de reproduction sous l'influence des hautes températures (34 et 35°C) était réversible.

La forme approximativement hyperbolique de la courbe de prépatence a pour conséquence une accélération du développement qui est pareille pour les températures entre 16 et 32°C (les valeurs de la vitesse de développement v se trouvent sur une ligne droite ; v. figure). Une variation journalière sinusoïdale de la température autour d'une moyenne de par exemple 25°C devait alors donner une prépatence égale à celle de 25°C à température constante, ce qui a en effet été observé à 25 ± 5° et de même à 30 ± 5°C. Une inversion du régime de lumière (température maximale dans l'obscurité) a donné des résultats identiques au régime normal.

Des expériences de températures constantes différentes pour des périodes définies ont été effectuées pour détecter d'éventuelles réactions différentes pendant certaines phases du développement de *S. mansoni*. Une température élevée de par exemple 28°C donnée pendant une période quelconque après l'infestation, avant d'être ramenée à 19°C, raccourcit la prépatence exactement en fonction de sa durée. Le calcul de la période de prépatence se fait par simple addition des "sommes de température", en prenant en considération la durée et la valeur moyenne d'une certaine température. A des températures plus basses (16°C) par contre, une élévation à 25°C pendant les premières semaines après l'infestation pourrait avoir comme conséquence un certain raccourcissement de la période de prépatence.

L'effet des températures mesurées dans un biotope naturel sera cependant toujours difficile à évaluer. Le moment exact de l'infestation des mollusques ne sera généralement pas connu. Les mollusques peuvent, en outre, choisir des microhabitats à températures différentes ou absorber directement des rayons solaires. Une évaluation approximative pourrait toutefois être utile dans certains cas pour une application plus rationnelle des mesures de contrôle, en tenant compte du climat de la saison en cours.

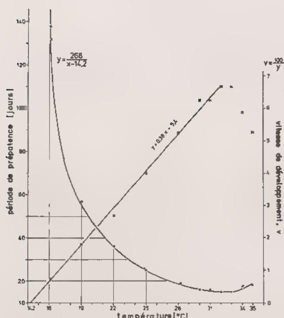
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FOSTER R., 1964. - The effect of temperature on the development of *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the intermediate host. *J. Trop. Med. Hyg.*, *67* : 289-292.

PFLÜGER W., 1978. - Ecological studies in Madagascar of *Biomphalaria pfeifferi*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. 1. Seasonal variations and epidemiological features in the endemic area of *Ambositra*. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, *45* (1) : 79-114.

PITCHFORD R.J. et VISSER P.S., 1965. - Some further observations on schistosomose transmission in the Eastern Transvaal. *Bull. Wld Hlth Org.*, *32* : 83-104.

SHIFF C.J. et EVANS A., 1975. - Seasonal influence on the production of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* cercariae in Rhodesia. *Intern. J. Paras.*, *5* : 119-123.



LEGENDE

Durée minimale de développement en jours (points) et vitesse de développement v (croix) d'une infestation de S. mansoni par rapport à de différentes températures constantes.

Minimum prepatency period (points with hyperbola) and speed of development (crosses with straight line) at constant temperatures from 16° to 35° C.

Haliotis, 8, 1977.
p. 155 à 173

APPORT DES TECHNIQUES DE TRANSPLANTATION A LA CONNAISSANCE DE LA PRODUCTIVITE DE *SCHISTOSOMA MANSONI* CHEZ LE MOLLUSQUE VECTEUR *BIOMPHALARIA GLABRATA*

par Joseph Jourdane (*)

RESUME

La mise au point de techniques fines de transplantation d'explants tissulaires de Planorbes parasités par *S. mansoni* sur des Planorbes indemnes a permis d'obtenir une troisième génération de sporocystes productrice de cercaires. Ce processus de multiplication, parfaitement reproductible, pourrait intervenir dans le cycle naturel de reproduction de *S. mansoni*.

CONTRIBUTION OF TRANSPLANTATION TECHNIQUES THE STUDY OF *SCHISTOSOMA MANSONI* PRODUCTIVITY IN VECTOR SNAILS *BIOMPHALARIA GLABRATA*

SUMMARY

The developmental precise techniques for transplantation of tissues fragments from infected snails by *S. mansoni* into uninfected snails has allowed us to obtain a third generation of cercariae-forming sporocysts. This means of multiplication, which is perfectly reproductible, could form part of the natural reproduction cycle of *S. mansoni*.

Malgré les nombreux travaux consacrés à l'évolution larvaire de *Schistosoma mansoni* chez son Mollusque vecteur, les données concernant la multiplication et la régulation des générations larvaires chez cet hôte demeurent encore fort imprécises. Notamment, la détermination du nombre de générations de sporocystes et de l'effectif larvaire de chaque génération relève encore de l'estimation. A ce sujet, il est traditionnellement admis par les auteurs que le nombre de générations de sporocystes est limité à deux, la deuxième génération étant seule productrice de cercaires. L'étude du développement larvaire de *S. mansoni* à l'aide des techniques de transplantation parasitaire nous a permis de montrer que ce schéma d'évolution n'avait pas une valeur générale mais pouvait, par contre, présenter des caractères notablement différents.

(*) Département de Biologie Animale, Centre Universitaire, 66025 Perpignan Cédex (France)

Notre expérimentation a consisté à transplanter sur des Planorbes receveurs indemnes des explants de 1 mm^3 de glande digestive de Planorbes parasités depuis 30 jours. Les explants hébergent de 4 à 8 sporocystes II. Le couple hôte-parasite est composé par une variété albinos de *Biomphalaria glabrata* et une souche brésilienne de *S. mansoni*. La technique de transplantation s'inspire en partie de celle utilée par Chernin (1966) chez différentes espèces de *Biomphalaria*. La transplantation des greffons s'effectue sous anesthésie dans le sinus céphalo-pédieux du Mollusque à l'aide d'une microseringue. Les règles classiques d'aseptie sont scrupuleusement observées au cours des manipulations. Le taux de mortalité n'a jamais été supérieur à 10 % pour l'ensemble de nos expériences.

Bien que ce programme de recherche soit en cours, nous avons déjà acquis plusieurs résultats qui nous permettent de préciser les grandes lignes de la phase d'invasion du Planorbe :

- les composants parasitaires du greffon (Sp II), parfaitement vivants, sont visibles dans le sinus céphalo-pédieux pendant une douzaine de jours. Durant cette période, une émission cercarienne très faible a lieu (une vingtaine de cercaires en moyenne sont émises par jour) ; ces cercaires ont pour origine les bourgeons cercariens présents dans les Sp II transplantés ;

- l'observation régulière par transparence des tissus ne nous a pas permis de déceler de formes parasitaires environ avant le 45ème jour suivant la transplantation. Après ce délai, on assiste à une colonisation régulière de la glande digestive et génitale du Planorbe par des sporocystes ;

- deux mois après l'infestation, les premières cercaires sont émises : cette émission augmente en même temps que l'invasion parasitaire progresse.

Ces observations, encore que préliminaires, rendent néanmoins compte de l'existence, chez *S. mansoni*, d'un cycle de reproduction larvaire différent de celui classiquement connu. Les transplantations ont en effet eu pour résultat d'induire le développement d'une génération supplémentaire de sporocystes assurant l'infestation de l'ensemble des tissus de l'hôte. Ces formes larvaires appartiennent indiscutablement à une troisième génération de sporocystes nés à partir des Sp II implantés. Notons que ces Sp III sont capables d'essaimer dans tout le corps du Planorbe de la même façon que les Sp II dans les infestations naturelles.

Nous devons à la vérité de signaler que deux travaux d'auteurs américains, Lie (1969) et Di Conza (1972), faisaient déjà état de l'obtention expérimentale de Sp III. Lie mentionnait l'apparition dans des Sp II en voie de dégénérescence, à la suite d'infestations multiples, de Sp III anormaux, non productifs. Di Conza signalait la formation de Sp III dans quelques rares expériences de transplantation réalisées selon un protocole différent du nôtre. Dans les deux travaux, le développement de Sp III apparaissait néanmoins comme un processus exceptionnel, auquel on ne pouvait attribuer en toute logique une réelle importance biologique.

Nos résultats, bien que partiels, révèlent par contre que la production d'une troisième génération de sporocystes est un processus parfaitement reproductible, puisque nous

l'avons observé au cours de chaque expérience de transplantation réussie. Nous pensons que ce phénomène de multiplication pourrait intervenir en certaines circonstances dans le cycle de reproduction larvaire de *S. mansoni*. Les conditions qui président à l'apparition de cette troisième génération restent à découvrir.

REFERENCES

CHERNIN E., 1966. - Transplantation of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. *J. Parasit.*, *52* (3) : 473-482.

DI CONZA et HANSEN E., 1972. - Multiplication of transplanted *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts. *J. Parasit.*, *58* (1) : 181-182.

LIE K.T., 1969. - Role of immature rediae in antagonism of *Paryphostomum segregatum* to *Schistosoma mansoni* and larval development in degenerated sporocysts. *Z. Parasitenk.*, *32* : 297-315.

Haliotis, 8, 1977.

INVENTAIRE, REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET ECOLOGIE DES MOLLUSQUES DULCAQUICOLES D'HAITI (CARAIBES)

par G. Robert[*], G. Mandahl-Barth[**] et C. Ripert[*]

RESUME

Les prospections malacologiques systématiques effectuées dans les points d'eau de la République d'Haïti permettent de porter à 18 le nombre des espèces dulcaquicoles inventoriées. *Lymnaea cubensis* est l'hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* et la distomatose bovine est très répandue dans l'île, tant en Haïti qu'en République Dominicaine où des cas humains de fasciolose sont sporadiquement rencontrés. *Biomphalaria glabrata* transmet *Schistosoma mansoni* dans l'est de la Dominicanie, où trois foyers de bilharziose intestinale sont répertoriés, mais la maladie n'existe pas en Haïti car l'aire de répartition de l'hôte intermédiaire de l'helminthe semble limitée dans ce pays à la basse plaine du Nord, où la schistosomiase n'a pas été introduite.

FRESHWATER SNAILS OF THE HAITIAN REPUBLIC.
LIST OF SPECIES, GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND ECOLOGY.

SUMMARY

Eighteen species of freshwater snails have been collected in the waterbodies of the Haïtian Republic. *Lymnaea cubensis* is the intermediate host of *Fasciola hepatica*, fasciolasis is widespread among cattle in the iland and human cases of the disease have been recorded in Haïti and in the Dominican Republic. *Biomphalaria glabrata* is transmitting *Schistosoma mansoni* in the Dominican Republic but human bilharziasis has never been observed in Haïti, the geographic distribution of the intermediate host of *S. mansoni* beeing restricted to the Northern Plain of the Country where the disease has not been introduced yet.

Traversée en son centre par le 19ème parallèle, l'Ile d'Hispaniola est occupée, dans sa partie occidentale, par la République d'Haïti (28.676 km^2) et dans sa partie orientale par la République Dominicaine (48.577 km^2).

Le relief d'Haïti est plus accentué que celui de la République Dominicaine, qui possède cependant le sommet le plus élevé des Antilles, le Pic Trujillo (3,175 m). L'étude de la carte dressée par Moral (1955)(Fig. 1) montre qu'en Haïti, les chaines méridionales constituent la presque totalité de la presqu'île du Sud, où l'on rencontre cependant deux grandes plaines, celles des Cayes et de Léogane. Ces presqu'îles du Nord et du Sud sont

(*) Institut Français d'Haïti C.P. 131
Port-au-Prince Haïti

(**) Dansk Bilharziasis Laboratorium Jaegersborg Allée ID
2920 Charlottenlund, Danmark

séparées l'une de l'autre par la Plaine du Cul de Sac. Dans la presqu'île du Nord, les chaînes septentrionales et le Plateau Central forment des complexes entre lesquels sont intercalées les plaines de l'Artibonite, des Gonaïves, de l'Arbre, de Jean Rabel et Moustique, ainsi que la grande Plaine du Nord.

L'étude de la géologie générale et régionale d'Haïti et la carte géologique établie par Butterlin (1960) (Fig. 2) montrent qu'il n'y a presque pas de roches acides en Haïti, sauf quelques roches feldspathiques dans le Massif du Nord, des sables quartzeux situés dans les vallées des rivières de la Plaine du Nord, quelques argiles schisteuses et des grès, mais la surface de ces affleurements est peu importante par rapport à celle de l'ensemble de la République haïtienne. La plupart des plaines du pays sont formées d'alluvions récentes, graviers, sables et argiles. Les formations miocènes du Plateau Central, de la Plaine de Jean Rabel et de la Plaine Moustique sont calcareuses et des calcaires récifaux, coquilliers ou conglomératiques quaternaires sont souvent disposés en étroites bandes côtières.

Le réseau hydrographique possède peu de grandes rivières permanentes, à courant lent en plaine, telles que l'Artibonite. La plupart des cours d'eau sont des ravines souvent asséchées, aux débits violents succédant aux averses. Les étangs sont situés en plaine ou en altitude. Dans les grandes plaines, des marais au niveau hydrique variable, des canaux d'irrigation et de drainage, constituent un réseau important au débit non permament. L'importante infiltration de l'eau dans le calcaire donne naissance à de nombreuses sources. Près des côtes, des lagons aux eaux saumâtres communiquent plus ou moins directement avec la mer et recueillent des eaux d'infiltration ou de précipitations.

Le climatd'Haïti présente les caractéristiques générales d'un climat tropical, modéré par le grand développement des côtes et le relief accentué, mais l'examen des Bulletins Météorologiques (x) montre que les différentes régions d'Haïti sont très inégalement arrosées : 600 mm par an dans la Plaine des Gonaïves, alors que dans la Plaine du Nord les précipitations atteignent 2000 mm et 3.600 mm au Sud de Jérémie. La température annuelle moyenne à basse altitude varie entre 24 et 27°C.

La liste détaillée des sites prospectés, comportant 162 numéros de récolte, la description des biotopes avec l'inventaire de la flore aquatique et des plantes du bord de l'eau de chaque gîte (Fig. 3), les mollusques récoltés et les cartes topographiques au 100.000° portant les emplacements exacts visités, sont déposés au Centre de Détermination des Mollusques de l'Organisation Mondiale de la Santé, au Laboratoire Danois de la Bilharziose à Charlottenlund.

(x) Service Météorologique National. Damien. Haïti.

CLE POUR LA DETERMINATION DES MOLLUSQUES DULCAQUICOLES D'HAITI

1. Prosobranches (présence d'un opercule).. 2
Pulmonés (absence d'un opercule).. 6

2. Coquille hémisphérique avec spire courte...................................... 3
Coquille cônique ou plus haute, avec spire haute............................. 4

3. Coquille atteignant 22 mm de largeur, avec des lignes foncées en zig-zag ou d'autres motifs................ *Neritina virginea*
Coquille dont la largeur est inférieure à 6 mm, de couleur unie...... *Neritilia succinea*

4. Coquille ayant moins de 6 mm de haut, sans granulation.........................5
Coquille atteignant 25 mm de haut, sculptures granulaires........... *Melanoides granifera*

5. Plus grosse, avec 6 tours mesurant 5 à 6 mm de haut............... *Potamopyrgus coronatus*
Plus petite et plus mince, avec 6 tours ne mesurant que 4 mm de haut.... .... *Potamopyrgus parvulus*

6. Coquille enroulée en spirale.. 7
Coquille en forme de bouclier.................................. *Ferrissia irrorata*

7. Coquille acuminée, plus haute que large....................................... 8
Coquille en forme de disque, plus large que haute............................. 9

8. Coquille senestre et très brillante............................ *Physa marmorata*
Coquille dextre et non brillante................................ *Lymnaea cubensis*

9. Coquille complètement développée mesurant moins de 12 mm de diamètre.......... 10
Coquille complètement développée mesurant plus de 15 mm de diamètre........... 15

10. Organe copulateur avec flagelles, coquille portant généralement un angle au-dessus de la périphérie.. 11
Pas de flagelle, coquille sans angle au dessous de la périphérie............. 14

11. Coquille formée de 4 tours augmentant rapidement, avec des lignes spirales distinctes. Diamètre de la coquille inférieure à 5 mm............ *Antillorbis aeruginosus*
Coquille formée de 5 à 7 tours, augmentant sans lignes spirales distinctes.... 12

12. Coquille petite, de 4 à 5 mm de diamètre, relativement haute (tours plus hautes que larges).. *Drepanotrema anatinum*
Coquille plus grosse et beaucoup plus plate, tours plus larges que haute.. 13

13. Coquille brillante avec une face inférieure concave et un angle obtus au dessous de la périphérie.. *Drepanotrema lucidum*
Coquille moins brillante, avec une face inférieure plane et un angle aigu.. *Drepanotrema cimex*

14. Coquille complètement développée formée de 4 à 4,5 tours augmentant rapidement... *Biomphalaria albicans*
Coquille complètement développée formée de 5,5 tours augmentant plus lentement... *Biomphalaria havanensis*

15. Coquille complètement développée (de 25 mm de diamètre) formée de 7 tours augmentant lentement.. *Biomphalaria glabrata*
Coquille complètement développée (de 20 mm de diamètre) formée de 5 tours augmentant plus rapidement, parmi lesquelles les 4 premières ont un angle net près des sutures à la face inférieure..................... *Helisoma foveale*

REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET HABITAT DES MOLLUSQUES

1. - *Neritina (Vitta) virginea* (L.)

Nerita virginea Linnaeus 1758, *Syst. Nat.* Ed. X p. 778.

Prosobranche d'estuaires de rivières, de drains ou de mares presque dépourvus de végétation, en relation avec la mangrove ou communiquant avec la mer. Probablement marine à l'origine, l'espèce s'est secondairement adaptée aux eaux saumâtres et douces.

2. - *Neritilia succinea* (Récl.)

Nerita succinea Réclus 1841, *Rév. zool.* p. 343.

L'habitat de *N. succinea* est voisin de celui de *N. virginea*, mais cette espèce remonte plus haut dans les rivières et supporte des courants plus rapides.

3. - *Potamopyrgus coronatus* (Pfr.)

Paludina coronata Pfeiffer 1839, *Wiegmann's Arch. f. Naturg. I.* p. 253.

Espèce ubiquitaire, rencontrée dans des biotopes aussi variés que l'Etang Saumâtre, des étangs d'eau douce, des rivières à courant rapide ou à courant lent, des marais, fossés, mares, drains ou canaux, à eaux limpides ou troubles, envahis par la végétation aquatique ou dépourvus de plantes. La coquille est généralement ornementée d'une couronne d'épines, mais cette ornementation est peu développée ou presque absente chez certains spécimens.

4. - *Potamopyrgus parvulus* (Guild.)

Paludina parvula Guilding 1828, *Zool. J. Lond. 3*, p. 537, Pl 28, Fig. 1-3.

P. parvulus est une espèce rencontrée en plus petite quantité dans la dition que la précédente dans des gîtes à eaux claires, peu envahis par la végétation aquatique : drains, rivières, rive du Grand Etang de Miragoane. *P. parvulus* est plus petit et a une coquille plus mince que *P. coronatus*.

5. - *Melanoides (Tarebia) granifera* (Lam.)

Melania granifera Lamark 1816, *Anim. S. vert. 8*, p. 433.

Prosobranche rhéophile habitant les rivières à eaux claires, courant rapidement sur fond de galets, de graviers ou de sables. L'espèce a colonisé les lacs alimentés par ces rivières. Seule espèce nettement rhéophile de la dition, elle vit généralement isolée. *M. granifera* est une espèce de l'est de l'Inde. Elle a été introduite il y a plusieurs années à Porto Rico. Aux Indes, elle est l'hôte intermédiaire de *Paragonimus*.

6. - *Stenophysa marmorata* (Guild.)

Physa marmorata Guilding 1828, *Zool. J. Lond.*, *3*, p. 534.

C'est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans la dition. Elle habite tous les types de gîtes d'eau douce, les petites mares et les canaux de ruissellement, les marais, les mares, les canaux d'irrigation et de drainage, les rivières à courant lent, les sources, les étangs.

7. - *Lymnaea cubensis* Pfr.

Limnaea cubensis Pfeiffer 1839, *Wiegmann's Arch. f. Naturg.*, *1*, 354.

L. cubensis apparait comme une espèce rencontrée en abondance dans des points d'eau aussi variés que les torrents de montagne, à courant rapide, eaux claires et fond de roches ou de galets dont un bief est souvent transformé en cressonnière, les rivières de plateaux ou les gîtes de plaine. Ces derniers peuvent être des rivières à courant relativement rapide et fond rocheux, où les mollusques se rencontrent alors sur les bords ou dans un bief latéral à courant plus lent, sur des pierres au voisinage de la surface ou même sur la vase en dehors de l'eau, car ils sont volontiers amphibies. Mais les principaux gîtes à Lymnées sont représentés par le cours principal des rivières de plaine à eaux calmes et fond de vase, souvent encombré par une abondante végétation aquatique, par les rivières, les drains et les canaux, les marais et les mares quelquefois presque à sec, les petits ruisseaux et les sources souvent aménagées pour la culture du cresson de fontaine.

Soumises à d'importantes variations saisonnières, les populations de Lymnées régressent en saison sèche, notamment dans les grandes plaines du pays où prédominent les gîtes temporaires tels que les rizières, qui sont alors fréquemment transformées en paturages après la récolte.

Fasciola hepatica parasite 48 à 60 % des foies de bovins abattus à Port-au-Prince. Les trois plus grands foyers de distomatose bovine du pays sont situés dans la région de Torbek dans la plaine des Cayes, dans la plaine de l'Artibonite et dans la plaine du Nord, qui sont des régions de marais, de rizières et d'élevage. Mais de nombreux foyers plus petits, quelquefois limités à un seul point d'eau en ce qui concerne le site de transmission existent en de nombreux points du pays. En République Dominicaine, les foyers de fasciolose sont disséminés dans l'ensemble du pays (Nemo et al. 1973) où 30 à 90 % des bovins éliminent des oeufs de *Fasciola hepatica* dans leurs bouses, et l'étude de l'écologie de *L. cubensis* a fait l'objet de travaux scientifiques (Alvarez, 1974).

8. - *Biomphalaria glabrata* (Say)

Planorbis glabratus Say 1818, *J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, *1*, 280.

B. glabrata a une distribution qui, en Haïti, semble limitée à la basse Plaine du Nord, alluviale et marécageuse, au niveau des habitations Vaudreuil et Daut, dans la région de rizières et d'élevage mal drainée par le grand canal abandonné qui se jette à

la Voute dans la rivière du Haut du Cap. L'espèce est beaucoup plus répandue en République Dominicaine. Elle y est l'hôte intermédiaire de *S. mansoni* dans l'est du pays où trois foyers de bilharziose intestinale se sont constitués à Hato Mayor, El Seybo et Higuey (*). La bilharziose intestinale a peu de chances de s'installer en Haïti car les travailleurs haïtiens des plantations de cannes employés dans l'est de la Dominicaine sont, pour la plupart, originaires des régions de Jacmel, Bainet, Côtes de Fer où *B. glabrata* n'a pas été rencontré. Mais il y a lieu toutefois de surveiller l'apparition éventuelle de l'helminthiase en Haïti dans la Plaine du Nord où elle pourrait être introduite, en provenance de la République Dominicaine ou d'autres pays des Antilles.

9. - *Biomphalaria havanensis* (Pfr.)

Planorbis havanensis Pfeiffer 1839, *Wiegmann's Arch. f. Naturg.*, *1*, 354.

B. havanensis habite les rivières à eaux troubles, courant lent, fond de vase, dont le lit est généralement encombré de végétation, les canaux et les fossés de drainage. Le réseau hydrographique des grandes plaines du pays constitue l'habitat principal de l'espèce. Mais on le rencontre encore dans le cours terminal des petites rivières descendant les mornes et courant sur les bandes côtières.

B. havanensis est le Planorbidé le plus communément rencontré. Il mesure 10x3 mm environ, possède un ombilic large de 4,5 à 5 mm de diamètre et 5,5 à 6 spires augmentant lentement.

10. - *Biomphalaria albicans* (Pfr.)

Planorbis albicans Pfeiffer 1839, *Wiegmann's Arch. f. Naturg.*, *1*, 354.

B. albicans est une espèce moins fréquemment rencontrée que *B. havanensis* et habite des biotopes apparemment mieux oxygénés, constitués le plus souvent par des rivières à eaux plus claires, courant quelquefois assez rapidement sur fond de galets, ou par des canaux d'irrigation ou des sources. L'espèce habite encore les bordures des étangs Bois-Neuf, Laborde-Marchand et de l'Anse-à-Veaux. Les gîtes à *B. albicans* sont le plus fréquemment rencontrés dans les plaines alluviales du pays mais ils sont alors souvent situés dans le haut de la plaine, au pied des mornes où les eaux ont un cours plus rapide.

B. albicans ressemble à *B. pfeifferi* (Krauss) de l'Afrique. Il est légèrement plus petit que *B. havanensis*, possède un ombilic plus étroit et 4,5 à 5 spires augmentant rapidement.

11. - *Drepanotrema anatinum* (d'Orb.)

Planorbis anatinus d'Orbigny 1835, *Mag. de Zool.*, *5*, 28.

D. anatinum habite les gîtes à eaux stagnantes où à courant faible ou nul, très encombrés par la végétation aquatique, à fond de vase. Les mares, les marais, les fossés

(*) Estado actual de la Bilharziosis en Santo Domingo. 1973. Secretario de Estado de salud publica y asistencia social. Division de Epidemiologia. Santo Domingo. Republica Dominicana.

de drainage en bordure de route ou de drains des rizières, les rivières dans des biefs à courant très ralenti ou dans les flaques résiduelles situées dans leur lit en saison sèche, constituent les biotopes typiques de l'espèce.

La coquille est petite, relativement haute, l'ombilic étroit et les spires enveloppantes. Elle mesure 4 x 1,5 mm.

12. - *Drepanotrema lucidum* (Pfr.)

Planorbis lucidus Pfeiffer 1839, *Wiegmann's Arch. f. Naturg. 1*, 354.

D. lucidum est une espèce de bordures d'étangs, de mares, de marais, de sources, de drains, de canaux, quelquefois rencontrée dans des biefs de rivières à courant faible ou nul. Les gîtes sont caractérisés par des eaux claires, dormantes ou peu agitées, à fond de vase et à flore aquatique abondante et variée.

D. lucidum est légèrement convexe sur la face supérieure et concave sur la face inférieure, d'aspect vernissé, avec 5 spires environ présentant un angle obtus. La taille de la coquille est 6,5 x 1,7 mm.

13. - *Drepanotrema cimex* (Moric.)

Planorbis cimex Moricand 1839, *Mém. Soc. Phys. Hist. nat. 8*, 143.

D. cimex est une espèce de drains, canaux, fossés, sources, marais et étangs envasés et encombrés par la végétation aquatique, quelquefois rencontrée dans les rivières lorsque le courant est faible ou nul, toujours dans des gîtes à eaux claires.

D. cimex possède une coquille très plate, consistant en six spires augmentant lentement et présentant un angle distinct. La coquille mesure 6,2 x 1,0 mm environ.

14. - *Antillorbis aeruginosus* (Mor.)

Planorbis aeruginosus Morelet 1851, *Test. noviss. Ins. Cuba*, 15.

A. aeruginosus a été récolté dans deux rivières à eaux claires courant assez rapidement sur fond de gravier, dans un canal d'irrigation à courant rapide et fond de roches, dans une rizière drainée par un canal et dans une flaque d'eau située en bordure de route.

A. aeruginosus ressemble à *Gyraulus*, présente des lignes spirales distinctes et mesure 4,2 x 1,5 mm.

15. - *Helisoma foveale* (Mke)

Planorbis fovealis Menke 1830, *Synopsis Meth. Moll.* 37.

H. foveale habite principalement les étangs dont les berges sont envasées et encombrées par une végétation aquatique abondante et variée. Mais l'espèce a été rencontrée aussi dans une mare alimentée par une source, dans des fossés de drainage en bordure de route et dans une rivière à eaux calmes et fond de vase.

H. foveale est la plus grande des huit espèces de *Planorbidae* rencontrées dans la dition , après *B. glabrata*, et mesure 20 x 8 mm.

16. - *Ferrissia irrorata* (Guil.)

Ancylus irroratus Guilding 1828, *Zool. J. Lond.*, *3*, 535.

Récolté sur des blocs de calcaires miocènes dans le lac de retenue de Peligre et dans la rivière Boubon sur le Plateau Central, ainsi que sur des plantes aquatiques dans un canal d'irrigation de rizières situé dans une petite dépression alluviale et l'habitation Bois-Neuf, cet Ancilide habite les eaux claires et bien oxygénées.

17. - *Pisidium punctiferum* (Guppy)

Cyclas punctifera Guppy 1867, *Ann. Mag. nat. Hist.*,(3), *19*, 160.

Canal d'irrigation mal entretenu et encombré par des joncs, à eaux troubles, stagnantes et à fond de vase, situé dans le haut de la plaine alluviale de Léogane.

18. - *Eupera cubensis* (Prime)

Sphaerium cubense Prime 1865, *Smithsonian miscell. Coll.*, *145*, 58, fig. 60.

E. cubensis habite les mares et les étangs, près des berges encombrées par une végétation aquatique abondante et variée, ainsi que les rivières à courant faible ou presque nul et fond de vase, mais à eaux claires. Ce Bivalve vit fixé aux plantes aquatiques.

La plupart des plaines du pays (la plaine des Cayes, les environs d'Aquin, la région située entre les étangs de Miragiane et Petit et Grand Goave, la plaine de Léogane, celles du Cul-de-Sac et de l'Artibonite, les plaines de l'Arcahaie et des Gonaïves, les plaines du Limbé et de Port-Margot, la plaine du Nord) sont formées d'alluvions récentes, et c'est dans ces plaines que les mollusques ont été récoltés en plus grand nombre.Mais les calcaires quaternaires disposés en bandes côtières constituent un soubassement favorable au développement des mollusques et il en est de même des formations calcareuses miocènes du Plateau Central, de la plaine de Jean-Rabel, de la plaine Moustique et des formations éocènes-paléocènes qui dominent souvent les côtes. Plus rarement, des mollusques ont été récoltés dans certaines zones à soubassement formé d'argiles schisteuses ou de grès miocènes, de basaltes métamorphisés et altérés crétacés.

REFERENCES

ALVAREZ J.M., 1974 - *Rev. Fac. Cienc. Agron. Vet. Un. Auton. (Sto Domingo). 2,* 52-54.

BARKER H.D. et DARDEAU W.S., 1930 - *La flore d'Haïti (Port-au-Prince).*

BUTTERLIN J., 1960 - *Trav. Mém. Inst. Hautes Et. Am. latine* (Paris). *6,* 1-194.

GENTILINI M. LAROCHE V. et DEGREMONT A., 1964 - *Bull. Soc. Path. exot., 57,* 299-306.

HOLDRIDGE L.R., 1964 - *Ecologie de la République d'Haïti* (O.E.A.)

MORAL P., 1961 - Le paysan haïtien. *Thèse Lettres et Sc. humaines (Paris).*

UENO H., ALVAREZ J.M. MERCEN A.M.R. de et SANCHEZ V.M., 1973 - *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* (Tokyo). *13,* 59-68.

VARGAS-CASTRO M., 1973 - *Bol. Lab. vet. (San Cristobal). 1,* 37-40.

LEGENDE DES FIGURES

Fig. I - Carte schématique du relief de la République d'Haïti

Fig. 2- Carte géologique de la République d'Haïti

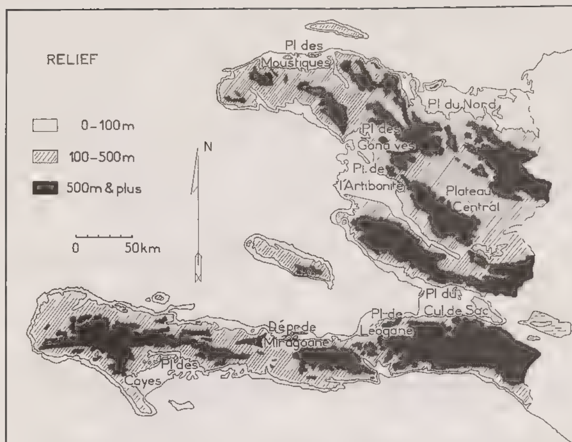
- I - Qal. : Alluvions (graviers , sables, argiles)
- 2 - Qc. : Calcaires récifaux, lumachelles, calcaires conglomératiques
- 3 - Tp. : Graviers, sables conglomérats, argiles grossières.
  - Tm. : Calcaires médréporiques, conglomérats, grès, argiles.
  - Tmi. : Argiles schisteuses et grès.
- 4 - Tbn. : Basaltes et tufs.
  - Tba. : Basalte à augite titanifère et diabases intrusives associées.
- 5 - Tom. : Calcaires à silex, calcaires madréporiques, argiles schisteuses.
  - To. : Calcaires crayeux à silex, calcaires cristallins.
- 6 - Tep : Calcaires cristallins, calcaires crayeux à silex, argiles impures, grès, conglomérats.
- 7 - Tdq. : Tufs andésitiques et andésites.
  - Ta. : Andésites, Bacites et roches intrusives associées.
- 8 - Mcs. : Calcaires cristallins, argilites, argiles schisteuses, radiolarites.
  - Mc. : Calcaires schisteux.
- 9 - Cdq. : Diorites quartzifères.
- 10 - Ca. : Andésites et dacites.
  - Cb. : Basaltes et roches intrusives associées.

Fig. 3 - Profils de gîtes type hébergeant des mollusques.

Fig. 4 - Coquilles des principaux mullusques dulçaquicoles d'Haïti.

Fig. 5 - Distribution des mollusques d'eau douce : Prosobranches et Bivalves.

Fig. 6 - Distribution des mollusques d'eau douce : Pulmonés.


RELIEF
0-100m
100-500m
500m & plus
0
50km
N
Pl des Moustiques
Pl du Nord
Pl des Gona ves
Pl. de l'Artibonite
Plateau Central
Pl du Cul de Sac
Pl de Léogane
Dépr de Miragoane
Pl des Cayes

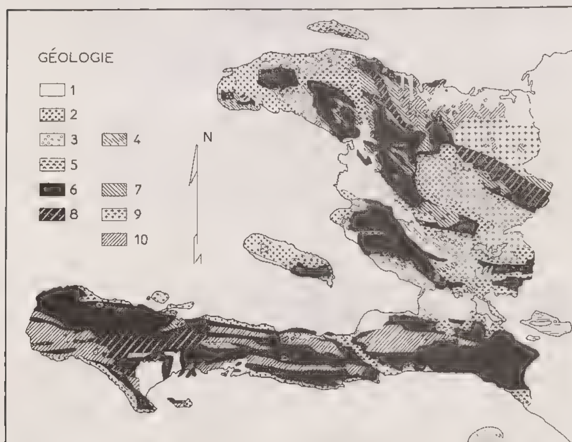

GÉOLOGIE
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
N

Fig et ?

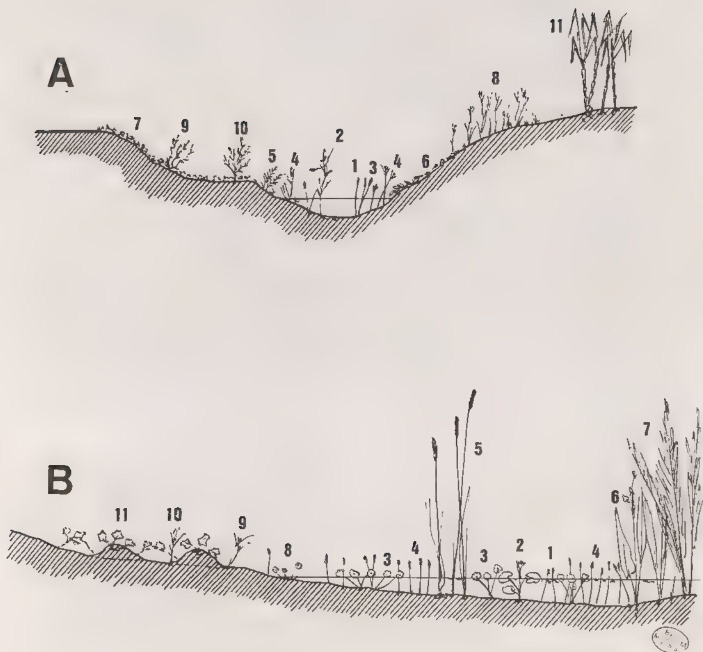


Fig. 3

1

1mm

2

1mm

3

1mm

4

1mm

5

1mm

6

7

8

1mm

5 mm



Fig. 4

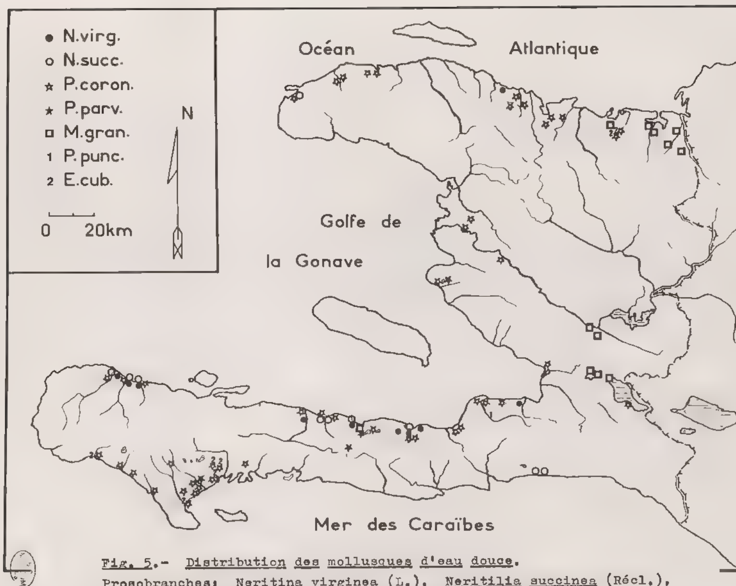


Fig. 5.- Distribution des mollusques d'eau douce.

Prosobranches: *Neritina virginea* (L.), *Neritilia succinea* (Récl.), *Potamopyrgus coronatus* (Pfr.), *Potamopyrgus parvulus* (Guild.), *Melanoides granifera* (Lam.).
Bivalves: *Pisidium punctiferum* (Guppy), *Eupera cubensis* (Prime).

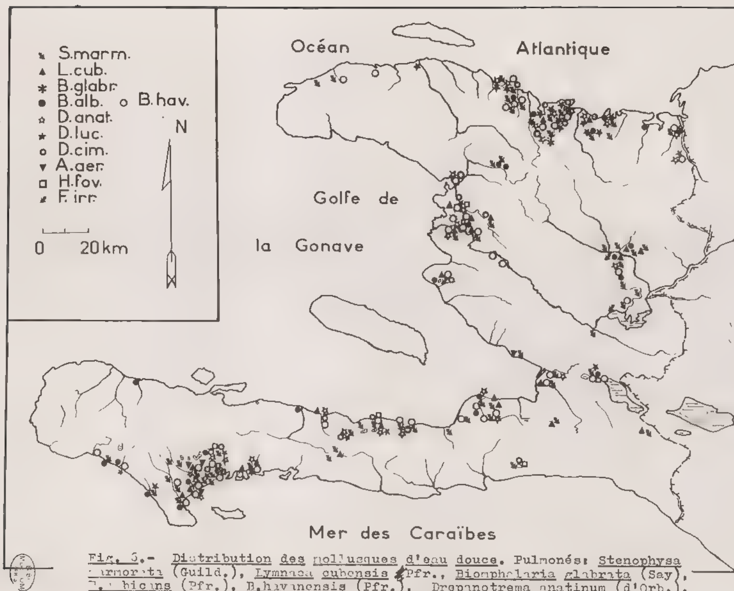


Fig. 5.- Distribution des mollusques d'eau douce. Pulmonés: *Stenophysa marmorata* (Guild.), *Lymnaea cubensis* Pfr., *Biomphalaria glabrata* (Say), *B. albicans* (Pfr.), *B. havanensis* (Pfr.), *Drepanotrema anatinum* (d'Orb.), *D. lucidum* (Pfr.), *D. cimex* (Moric.), *Antillorbis aeruginosus* (Mor.), *Helisoma foveale* (Mke), *Ferrissia irrorata* (Guild.).

Haliotis, 8, 1977.
P. 173 à P. 179

LES *LIMICOLARIA* (MOLLUSCA, PULMONATA) VECTEURS DE DISTOMES AU TOGO

par Henry Chevallier (*)

RESUME

Les *Limicolaria* de Kélégougan, près de Lomé (Togo), vecteurs de *Dicrocoelium hospes*, correspondent à deux espèces : *Limicolaria aurora* Jay, espèce polymorphe, et *Limicolaria bourgati* (nouvelle espèce).

THE *LIMICOLARIA* VECTORS OF DISTOMES IN TOGO

The *Limicolaria* living in Kelegougan, near Lome (Togo), vectors of *Dicrocoelium hospes*, are refered to two species : *Limicolaria aurora* Jay, a polymorphic species, and *Limicolaria bourgati* (a new specie).

La détermination des Limicolaires provenant de Kélégougan, près de Lomé (Togo), nous a été confiée par le Professeur Bourgat de l'Université du Bénin (Lomé). Ces Limicolaires sont les hôtes intermédiaires de *Dicrocoelium hospes* Looss qui occasionne une Discrocoeliose chez les Bovidés domestiques (Seguin, 1975).

Cette détermination s'est révélée assez difficile étant donné, d'une part le trop petit nombre de travaux taxonomiques effectués dans ce groupe de Mollusques et, d'autre part, le polymorphisme qui doit exister chez beaucoup d'espèces. Une révision sérieuse du genre *Limicolaria* (famille des *Achatinidae*) s'avère nécessaire. En effet, toutes les espèces de ce genre, vivant en Afrique occidentale, ont été décrites, principalement au siècle dernier, seulement d'après leur coquille. La "révision" de Crowley et Pain (1970), basée également sur les caractères conchyliologiques, n'est d'aucun secours. Seules quelques espèces ont vu leur anatomie génitale figurée par Mead (1950) et par Lopez et Rocandio (1959).

Par ailleurs, comme pour la plupart des Mollusques terrestres de l'Afrique occidentale, l'écologie des *Limicolaria* reste très mal connue. Seguin *(supr. cit.)*, dans son enquête épidémiologique, fournit toutefois ces indications sur les moeurs des Limicolaires de Kélégougan : "... le comportement de nos *Limicolaria* est nettement influencé par l'humidité du milieu ;

(*) Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie, 55 rue Buffon, 75005 Paris.

ils peuvent être qualifiés de mésophiliques. En saison sèche, leur activité diurne est nulle ; ils se réfugient dans les lieux qui ont conservé une faible hygrométricité, sous les feuilles d'aloès, d'opuntias, d'ananas dans le village ou bien, légèrement enfouis, dans l'humus aux pieds des arbustes du bush pastoral qui cerne le village. La nuit et au petit matin, avec la rosée, quelques uns redeviennent actifs. La majorité, durant cette période, obture sa coquille par un épiphragme. Pendant les saisons des pluies, leur récolte est facile en tous lieux, de jour et de nuit, dans les herbes hautes, sur les branches basses des arbrisseaux, dans les broussailles, en bordure des points d'eau récents. Les *Limicolaria* que nous avons observés pondent 25 à 50 oeufs jaunes, ovales, mesurant 5 mm sur 4, qu'ils enfouissent dans le sol aux endroits les moins ensoleillés".

Nous avons distingué dans ces Limicolaires deux espèces : *Limicolaria aurora* Jay, espèce polymorphe, et une nouvelle espèce que nous dédions au Professeur Bourgat.

LIMICOLARIA AURORA Jay (fig. 5 - 9)

Bulimus Aurora Jay, 1839, Cata. Shells, p. 119, pl. 6, fig. 2 (sans origine).
Bulimus spectralis Reeve, 1848, Icon. V, pl. 53, fig. 348 (sans origine).
Bulimus suffusus Reeve, *ibid.*, pl. 53, fig. 350 (sans origine).
Limicoria aurora Lopez et Rocandio, 1959, p. 39, fig. 21-22 (app. gén.), 23 (cavité palléale), 24 (mâchoire) et 25 (radula) (loc. : Fernando Poo).

Le *L. aurora* est une espèce bien identifiable dans sa variété typique (var. *aurora* = *spectralis* = *suffusus*) mais, grâce à une étude anatomique, conchyliologique et biométrique, nous avons rapporté à cette espèce deux autres formes : la variété *rufescens* (nlle var.) et la variété *tenebrica* (= *Bulimus tenebricus* Reeve). *L. aurora* présente ainsi, au Togo, un polymorphysme (polychromation de la coquille) accusé. Barker (1968) avait étudié un polymorphisme sans doute similaire chez des *L. aurora* de l'Ouest du Nigéria.

Variété *aurora* Jay (fig. 6)

Limicolaria aurora Germain, 1913, Moll. Miss. Gruvel., fig. 7 (loc. : Abomey, Dahomey).
Limicolaria aurora Lopez et Rocandio, 1959, pl. 2, fig. 88 (loc. Basuala, Fernando Poo).

La variété *aurora* se caractérise par une coquille unicolore, jaune paille, parfois rosacée. C'est cette dernière teinte que Barker appelait "unbanded pink". Il existe des formes de passage (fig. 7) entre cette variété unicolore et la variété flammulée que nous nommons *rufescens*.

Variété *Rufescens (nomen novum)* (fig. 5 et 8)

Limicolaria aurora Crowley et Pain, 1970, pl. 5, fig. 30 (loc. Cameroun).

Cette variété présente une coquille ornée de flammules verticales rousses, souvent estompées. Elle avait été reconnue par Barker qui la nommait "banded pink", ainsi que par

Crowley et Pain, mais n'avait pas reçu de dénomination latine. Nous proposons de l'appeler *rufescens*.

Variété *tenebrica* Reeve (fig. 9)

Bulimus tenebricus Reeve, 1848, *(supr. cit.)*, pl. 53, fig. 347 (loc. "Ibu" =Ijebu, Nigéria ?).
Limicolaria aurora Crowley et Pain, 1970, pl. 3, fig. 18 (loc. Akilla, Nigéria).

Les coquilles brun foncé de *L. aurora* du Togo paraissent bien correspondre avec la coquille figurée par Reeve sous le nom de *Bulimus tenebricus*. Crowley et Pain ont fait le même rapprochement.

Par contre, une mise en synonymie de ces deux auteurs que nous n'acceptons pas est de confondre *L. aurora* avec *L. numidica* Reeve. Cette dernière espèce a une coloration bien distincte des diverses variétés de *L. aurora* : coquille jaune vif ornée de flammules châtain très bien dessinées. Lopez et Rocandio avaient, d'ailleurs, trouvé de légères différences anatomiques entre ces deux espèces.

LIMICOLARIA BOURGATI, nouvelle espèce (fig. 1 - 4 et 10)

La coquille de cette nouvelle espèce est assez élancée, le rapport hauteur/diamètre ayant des valeurs de 2,10, 2,17 et 2,44. Chez *L. aurora*, la valeur maximale H/D est de 2,30 mais l'espèce présente des coquilles assez ventrues avec des valeurs de 1,96 et 1,83 (fig. 7). Par ailleurs, *L. bourgati* est de taille plus petite que *L. aurora* : hauteur maximale de la coquille : 55 mm contre 64 mm pour l'*autora*. Le diagramme de la figure 11 illustre les corrélations existant entre la hauteur et le diamètre de la coquille pour les deux espèces à Kélégougan.

La coloration générale de la coquille de *L. bourgati* est jaune rosacé ; ses flammules sont châtain, bien marquées, ce qui distingue l'espèce de la var. *rufescens* de *L. aurora* qui, elle, présente des flammules rousses estompées. La suture des tours apparaît, à l'oeil nu, comme une ligne blanche, effet dû à un bourrelet qui surplombe la suture, ce caractère n'existant pas chez *L. aurora*. Enfin, le test de la coquille de *L. bourgati* présente des microcostulations verticales mamelonnées qui lui donnent un aspect treillissé. Chez *L. aurora*, ce treillissage est bien moins marqué, le test paraissant souvent lisse à l'oeil nu.

L'appareil génital des deux espèces présente de légères différences : le pénis est plus trapu chez *L. bourgati* et son muscle rétracteur est bien plus long et plus fin que celui de *L. aurora* (fig. 2 et 5). Le spermiducte de l'*aurora* est souvent plus court que celui du *bourgati* ; toutefois, ce caractère n'est pas toujours constant, une certaine variabilité existant chez *L. aurora* quant à la longueur des canaux génitaux.

L. bourgati semble moins fréquent à Kélégougan que *L. aurora* : sur 67 individus que nous avons examinés, il y avait 56 *aurora* et 11 *bourgati*. Le matériel étudié a été déposé au Département de Malacologie du Muséum national d'Histoire naturelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARKER J.F., 1968. - Polymorphisme in West African Snails. *Heredity Lond.*, *23* (1) : 81-93.

CROWLEY T.E. et PAIN T., 1970. - A monographic revision of the african land snails of the genre *Limicolaria* Schumacher (Mollusca - Achatinidae). *Ann. Mus. Roy. Afr. Centr. Tervuren* (Sc. Zoo.), *177* : 61, 6 pl.

LOPEZ A.D. de Z. et ROCANDIO A.O. de Z., 1959. - Description de los moluscos terrestres de la Isla de Fernando Poo (Familia Achatinidae). Instituto dee Estudios Africanos edit., 128 p.

MEAD A.R., 1950. - Comparative genital anatomy of some Achatinidae (Pulmonata). *Bull. Mus. Comp. Zoo. Harvard College, Cambridge U.S.A.*, *105* (2) : 119-291, 9 pl.

SEGUIN D., 1975. - Contribution à l'étude des Distomatoses hépato-biliaires des Ruminants au Togo. Thèse vétér., *Ecole Nat. Vétér. Lyon*, *86* : 24 fig.

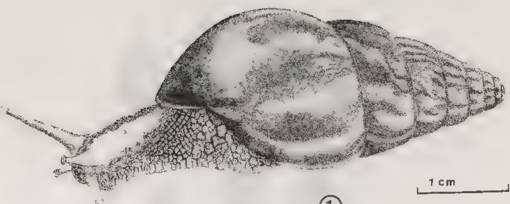
LEGENDES DES FIGURES

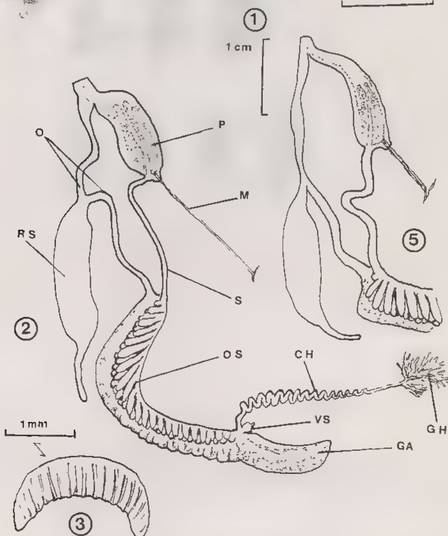
Fig. 1-4 - Limicolaria bourgati - 1 : animal vivant, dessin de S. Agbalo (Labo. du Prof. Bourgeat) d'après photo - 2 : appareil génital - 3 : mâchoire - 4 : radula.

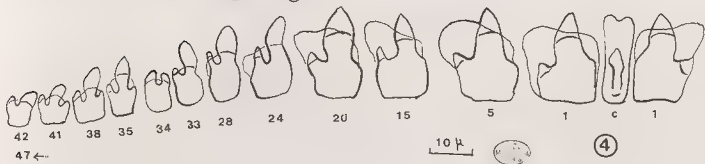
Fig. 5 - Limicolaria aurora, var. rufescens, partie sup. de l'appareil génital. Abréviations : CH, canal hermaphrodite - TA, glande à albumen - GH, glande hermaphrodite (ovotestis) - M, muscle rétracteur du pénis - O, oviducte - OS, ovispermiducte (canal godroné - P, pénis - RS, réceptacle séminal (poche copulatrice) -X, spermiducte - VS, vésicule séminale.

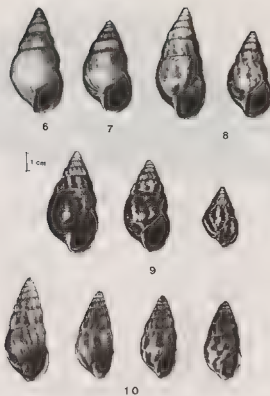
Fig. 6-9 - Limicolaris aurora - 6 : var aurora - 7 : var. aurora, passage à la var. rufescens - 8 : var. rufescens (syntypes de la var.) - 9 : var. tenebrica (adultes et juv.). Fig. 10.- Limicolaria bourgati (suntypes de l'espèce). Tous les individus proviennent de Kélégougan, région de Lomé (Togo).

Fig. 11 - Diagramme de corrélation entre la hauteur et le diamètre des coquilles des Limicolaria de Kélégougan.


1 cm
①


1 cm
O
P
M
RS
S
②
⑤
OS
CH
GH
VS
GA
1 mm
③


42
41
38
35
34
33
28
24
20
15
5
1
c
1
47 ←
10 µ
④


6
7
8
1 cm
9
10

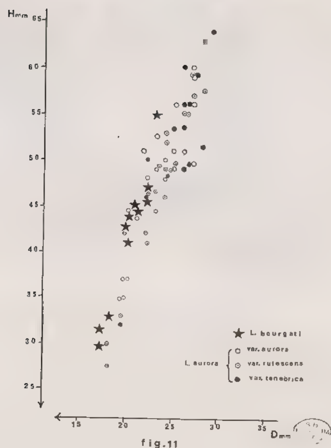

Hmm
65
60
55
50
45
40
35
30
25
L. bourgati
L. aurora
var. aurora
var. rufescens
var. tenebrica
15
20
25
30
35
Dmm

fig.11

Haliotis, 8, 1977.
p. 179 à 183

HELICIDAE (GASTEROPODA, PULMONATA) HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS ACTUALES O POTENCIALES, DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* EN LA PROVINCIA DE LEON, NOR-OESTE DE ESPANA

Por Yolanda Manga Gonzalez(*) y M. Cordero del Campillo(*)

RESUMEN

Los moluscos primeros hospedadores intermediarios de *Dicrocoelium dendriticum* en la provincia de Leon (España) son *Helicella itala, Cernuella (Heromagna) cespitum arigonis* y *Theba cathusiana*, según se ha comprobado experimentalmente.

Se estima que pueden actuar igualmente, aunque requieren confirmación experimental, las siguientes especies : *Cepaea nemoralis, Cernuella (Cernuella) virgata, C. (Microxeromagna) vestita, Candidula intersecta, C. rocandioi, Helicella bierzona, H. corderoi, H. jamuzensis, H. leiolema, H. matritensis, H. zaratei, Cochlicella barbara, Monacha (Ashfordia) granulata, Euomphalia (Mengoana) brigantina, Helix (Cryptomphalus) aspersa* y *Ponentina ponentina.*

LES *HELICIDAE (GASTEROPODA, PULMONATA)* HOTES INTERMEDIAIRES EFFECTIFS OU POTENTIELS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* DANS LA PROVINCE DE LEON DANS LA REGION DU NORD-OUEST DE L'ESPAGNE

RESUME

Les mollusques hôtes intermédiaires primaires de *Dicrocoelium dentriticum* dans la province de Léon (Espagne) sont d'après ce que nous avons montré expérimentalement : *Helicella itala, Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* et *Theba cathusiana.*

Il est estimé que peuvent également être actualisés, malgré la nécessité de confirmation expérimentale, les espèces suivantes : *Cepaea nemoralis, Cernuella (Cernuella) virgata, C. (Microxeromagna) vestida, Candidula intersecta, C. rocandioi, Helicella bierzona, H. corderoi, H. jamuzensis, H. leiolema, H. matritensis, H. zaratei, Cochlicella barbara, Monacha (Ashfordia) granulata, Euomphalia (Mengoana) brigantina, Helix (Cryptomphalus) aspersa* et *Ponentina ponentina.*

(*) Laboratorio de Parasitologia, Facultades de Veterinaria y Biologia, Leon, Espana.

THE *HELICIDAE (GASTEROPODA, PULMONATA)* EFFECTIVE OR POTENTIAL HOSTS OF *DICROCOELIUM DENDRITICUM* IN THE PROVINCE OF LEON IN NORTH-WESTERN SPAIN.

SUMMARY

The land snails acting as first intermediate hosts to *Dicrocoelium dendriticum* in the spanish province of Leon are *Helicella itala, Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* and *Theba carthusiana*, as determined experimentally.

As potential hosts may also act the following species (experimental demonstration pending) : *Cernuella (Cernuella) virgata, C. (Microxeromagna) vestita, Candidula intersecta, C. rocandioi, Helicella bierzona, H. corderoi, H. jamuzensis, H. leiolema, H. matritensis, H. zaratei, Cochlicella barbara, Monacha (Ashfordia) granulata, Euomphalia (Mengoana) brigantina, Helix (Cryptomphalus) aspersa* , *Ponentina ponentino and Cepaea nemoralis.*

La dicrocoeliosis, cuyo agente etiológico es el trematodo *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819), Looss 1899, es una enfermedad que aparece con caracter enzoótico en amplias zonas del mundo, Como es de todos sabido, en el complicado ciclo biológicode este parásito, intervien en dos hospedadores intermediarios, actuando como primeros diversas especies de moluscos terrestres.

Del Rio (1967) realizó una investigación sobre la distribución geográfica e importancia de la dicrocoeliosis bovina y ovina en nuestra provincia, hallando una gran frecuencia, particularmente en la zona montañosa, teniendo como resultado una repercusión económica elevada, sobre todo si se tienen en cuenta las infestaciones mixtas *Fasciola-Dicrocoelium* halladas en reses de matadero.

Según Cordero y col. (1975) en España se ha encontrado *D. dendriticum* en las provincias siguientes : Barcelona, Ciudad Real, Cordoba, Granada, León, Lugo, Madrid, Navarra, Oviedo, Palencia, Santander, Tarragona, Teruel, Valladolid, Zamora y Zaragoza. Cordero y Manga (1976), recogen, entre otras, las especies de moluscos que se han citado como hospedadores intermediarios de *D. dendriticum*, en diversos paises. Para lograrlo se revisaron las colecciones : *Helminthological abstracts, Index Catalogue of Medical and Veterinary Zoology, Revista Ibérica de Parasitologia*, y las obras de Cordero y col. (1975, 1976) Yamaguti (1958-61), Dawes (1956) y Malek y Cheng (1974), entre otras. Posteriormente hemos podido observar que, además de las citas que se recogen en el trabajo anterior, también han sido consideradas como hospedadores intermediarios de *D. dendriticum* las especies : *Cepaea nemoralis L., Cepaea vindobonensis* (PFEIF.), *Helicella candaharica* (PFEIF.), *Trichia eichwaldi* (PFEIF.) y *Trichia caucasicola* Y, La mayoría de las especies citadas son de paises de Europa Central y Oriental, así como de Asia Occidental, por esto no están presentes en nuestra provincia, aunque sí lo están otras que pertenecen a los mismos géneros, por lo que podrían ser hospedadores intermediarios del citado trematodo en nuestras latitudes.

Del Rio (1967) confirmó que las especies *Helicella itala* L. *Helicella (Xerocincta) neglecta* DRAP. y *Theba carthusiana* MULLER presentes en nuestra provincia, actuaban como hospedadores intermediarios. A nuestro juicio la cita de *Helicella (Xerocincta) neglecta* que este autor dio por primera vez no es correcta, pues estimamos que tal especie no existe en nuestra provincia, ni en España donde se ha citado alguna vez más ; suponemos que el autor se referiría a *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Rossmassler, 1854) bastante común en nuestras latitudes, donde ha sido hallada en 91 localidades distribuidas principalmente, entre las regiones naturales Transición y Central, con ecologia botanica en casi todos los casos de la Division *Chenopodio-Scleranthea* y en altitudes comprendidas entre 380-1060 m,

Cepaea nemoralis cuyo genital no vamos a proyectar por ser demasiado conocido, y *Cernuella (Cernuella) virgata*, que se han citado como hospedadores en otros paises, y que se encuentran en nuestra provincia, podían ser hospedadores potenciales, pero aún no se ha confirmado. Además de las especies citadas, otras presentes en nuestro territorio que, por pertenecer a géneros que, en otras latitudes incluyen especies hospedadoras intermediarias, podían tener una actuación similar, son : *Candidula intersecta* (POIRET, 1801), *Candidula rocandioi* (Ortiz de Zárate, 1950) ; *Cernuella (Microxeromagna) vestita* (Rambur, 1868) ; *Helicella bierzona* Gittenberger y Manga, 1977, *Helicella corderoi* Gittenberger y Manga, 1977, *Helicella jamuzensis* Gittenberger y Manga, 1977, *Helicella leiolema* (Westerlund, 1889), *Helicella madritensis* (Rambur, 1868), *Helicella zaratei* Gittenberger y Manga, 1977 ; *Cochlicella barbara* (Linnaeus, 1758) ; *Monacha (Ashfordia) granulata* (Alder, 1830 ; *Euomphalia (Mengoana) brigantina* (Da Silva Mengo, 1867) ; *Helix (Cryptomphalus) aspersa* Müller, 1774. Aunque, para nosotros, *Ponentina* es un género aparte de *Trichia*, que es el que se ha citado como hospedador intermediario de *D. dendriticum*, vamos a incluir aquí también la especie *Ponentina ponentina* (Morelet, 1845) que vive en nuestra provincia, y que, para muchos autores, se encontraría enclavada en el género *Trichia*.

Un hecho, relacionado, en cierta medida, con la supuesta potencialidad de estas especies como hospedadores intermediarios de *Dicrocoelium*, es que, a excepción de *Candidula rocandioi*, *Helicella jamuzensis* y *Helicella zaratei*, todos ellas, como veremos seguidamente las hemos encontrado parasitadas por trematodos, aunque por el momento, no se ha determinado cuales son estos. El examen parasitológico se llevaba a cabo, sobre el riñón y el hepatopáncreas, con la ayuda de un estereomicroscopio, Los resultados de este estudio fueron que de 24 ejemplares de *Candidula intersecta* examinados, 4,16 % estaban parasitados por trematodos en el riñón ; en *Cernuella (Cernuella) virgata* un

1,51 % de los 132 estudiados parasitologicamente, albergaban trematodos en el riñón y el 0,75 % en el hepatopáncreas ; *Cernuella (Microxeromagna) vestita* presentó 16,90 % parasitados en el riñón, y 7,04 % en el hepatopáncreas , sobre 71 ejemplares estudiados ; en *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* de los 982 ejemplares estudiados, el 15,47 % albergaba trematodos en el riñón y el 3,15 % en el hepatopáncreas ; en *Helicella corderoi* de 22 examinados el 9,09 % albergaba trematodos en el hepatopáncreas ; de 841 ejemplares de *Helicella itala nubigena* estudiados, 3,21 % poseian trematodos en el riñón y 8,20 % en el hepatopáncreas ; en *Helicella leiolema* entre 316 ejemplares investigados se hallaron el 4,15 % parasitados en el riñón y 2,49 % en el hepatopáncreas ; *Helicella madritensis* presentó entre 85 ejemplares, un 2,35 % con trematodos en el hepatopáncreas : de 226 ejemplares de *Cochlicella barbara* estudiados, 10,17 % contenían trematodos en el riñón ; *Monacha (Ashfordia) granulata* presentó un 2,94 % de parasitados en el riñón por trematodos, sobre 34 ejemplares examinados ; de 144 individuos de *Monacha (Monacha) cartusiana* el 22,22 % albergaba trematodos en el riñón y el 1,38 % en el hepatopáncreas ; examinados 37 ejemplares de *Ponentina ponentina* el 16,21 % contenía trematodos en el riñón ; en *Euomphalia (Mengoana) brigantina* el 12,12 % de 66 ejemplares estudiados, estaba parasitado en el riñón ; examinados 421 ejemplares de *Cepaea nemoralis* hallamos 9,02 % infestados en el riñón y 1,18 % en el hepatopancreas ; y finalmente, de 271 individuos de *Helix (Cryptomphalus) aspersa* estudiados parasitologicamente se encontró 9-22 % con trematodos en el riñón y 0,36 % en el hepatopáncreas.

BIBLIOGRAFIA

DAWES B., 1956 - The Trematoda. Cambridge Univ. Press, England.

CORDERO DEL CAMPILLO M. et 40 collaborateurs, 1975 - Indice-Catalogo de Zooparasitos Ibéricos. I. Protozoos. II. Trematodos. *Edit. Inst. Bayer, Barcelona.* 1-117.

CORDERO DEL CAMPILLO M. y MANGA GONZALEZ, M.Y., 1976 - Helmintos y Moluscos, con especial atencion a la familia Helicidae. *An. Fac. Vet. Leon, 22,* (1), 181-195.

GITTENBERGER E. y MANGA GONZALEZ M.Y., 1977 - Some new species of the genus *Helicella (Pulmonata, Helicidae)* from the province Leon, Spain. *Zool. Mededl., 51,* (11) : 177-189.

MALEK E.A. y CHENG Th.C., 1974 - Medical and Economical Malacology. Academic Press, New York and London.

RIO LOZANO J. del., 1967 - Epizootiologia de la dicroceliosis en la provincia de Leon. *An. Fac. Vet. Leon, 13,* 211-285.

YAMAGUTI S., 1958-61 - Systema Helminthum. Intersc. Pub. Inc., New York. 5 vol.

Haliotis, 8, 1977.
p. 183 à 187

A PROPOS DE REFUGIES LAOTIENS PORTEURS DE DOUVES (EN PARTICULIER D'UN ENFANT SOUFFRANT DE PARAGONIMOSE)

par Alix Delage (*) et René Bosc (**)

RESUME

Des migrations nouvelles, dont l'ampleur est souvent méconnue, nous entraînent à nous interroger sur le cycle de certains parasites de l'homme et sur les risques éventuels de leur "mondialisation".

ABOUT LAOAN FLUKE-CARRIER REFUGEES
(MORE PARTICULARLY ON A CHILD SUFFERING FROM PARAGONIMIASIS)

SUMMARY

Present migrations whose importance is often misappreciated lead us to consider the life cycle of some Parasites of man as well as the possible risks of a world-wide spreading.

Des problèmes se posent à l'occasion de diagnostics médicaux qui devraient se répéter actuellement à travers la France. 14.400 réfugiés du Sud-Est asiatique, du Laos en particulier, sont arrivés en France dans l'année. 40 % d'entre eux s'étant dispersés immédiatement, souvent chez des amis ou parents, leur état sanitaire n'a guère été contrôlé.

Le parasitologiste hospitalier a pour première tâche de faciliter le dépistage clinique et d'apporter la preuve parasitologique des lésions chez l'homme, en l'occurrence des distomatoses. Ceci est grandement facilité lorsque les sujets sont hospitalisés puisqu'on peut les examiner, les interrogier (dans la mesure où quelqu'un peut servir d'interprète souvent) et consulter leur dossier médical. Par contre, les difficultés sont grandes lorsque le contact direct avec le réfugié est impossible. Quant aux réfugiés n'hébergeant qu'un petit nombre de douves, ils ne présentent habituellement que très peu de signes cliniques ; leur dépistage devient particulièrement difficile et serait pourtant nécessaire, parfois dans leur intérêt

(*) Service de Parasitologie, Annexe de la Faculté de Médecine de Montpellier, Avenue Kennedy, S.U.P., 30000 Nîmes (France)

(**) Service de Pédiatrie, C.H.R.L., 30000 Nîmes (France)

propre, parfois aussi pour supprimer des réservoirs de virus d'Opistorchiase et - qui sait -, de Paragonimose.

La deuxième obligation du parasitologiste médical est son intervention dans une thérapeutique inhabituelle et l'évaluation des critères de guérison.

Son troisième rôle est clui d'un épidémiologiste. Il est certes facile de rassurer les infirmières sur la non-contagiosité de ces malades et sur l'absence de tout risque lors du maniement du matériel ayant servi aux endoscopies. Mais les cliniciens, les pédiatres en l'occurence, qui liront dans la Revue française des Maladies respiratoires de 1975, sous la plume de Sacdpraseuth (1), Coudert, Mojon et Tran Manh Sung (2) : "en Europe, le cycle évolutif ne paraît pas être réalisé", seront en droit de ne pas être satisfaits.

Le Laos, ses régions montagneuses surtout, fut longtemps un pays isolé et médicalement très mal connu ainsi que l'écrivaient Fontan (3), Beauchamp et Beaver (1975): "du fait de son éloignement et de son sous-développement, le Laos est longtemps resté à l'écart de la médecine occidentale, contrairement aux autres Etats de la péninsule indochinoise. Même avant la période de guerres qui vient de s'éteindre après vingt années, peu de travaux médicaux y avaient été faits". Or, ce pays est le lieu d'une Paragonimose qui semble très particulière : les auteurs qui viennent d'être cités décrivent même, dans cet article, une localisation et des caractères anatomo-pathologiques différant de ceux des lésions dues aux autres *Paragonimus* : "les kystes étaient creusés comme à l'emporte-pièce dans le parenchyme (et non dans des bronchioles) et dans des granulomes inflammatoires entourant les vers et leurs oeufs, sans cavité apparente, comme en un stade pré-kystique" (nécropsie d'un Laotien, 1969). L'espèce en cause est *Paragonimus heterotremus* dont les oeufs sont assez caractéristiques pour que nous pensions les avoir identifiés dans les expectorations du petit malade nîmois. Depuis quelque deux ans seulement, nous savons qu'il existe 25 espèces connues de *Paragonimus* dont 5 espèces pouvant parasiter l'homme (liste non limitative). Seul *P. heterotremus* est limité à un territoire géographiquement peu étendu : si cette ségrégation est due à des conditions épidémiologiques qui ne peuvent se rencontrer ailleurs, tout est bien. Cependant, il est à noter que les aires d'extension des autres Paragonimoses humaines sont extrêmement étendues :

- *P. kellicoti* se trouve en Amérique du Sud (Pérou) mais a été signalé chez l'homme en Amérique du Nord et jusqu'au Canada ;
- *P. westermani*, qui parasitait jusqu'à 57 % des tribus de l'intérieur à Formose, s'étendrait de la Corée à l'Indonésie et à l'Inde ;
- les deux espèces africaines *(P. africanus* et *P. uterobiloculatus)* sont bien connues de l'Afrique centrale (Côte d'Ivoire au Congo) mais quelques cas ont été signalés en Afrique du Sud.

(1) Département de Parasitologie, Vientiane (Laos)
(2) Département de Parasitologie et Pathologie exotique, 69000 Lyon (France)
(3) Département d'Anatomie-Pathologie, Ecole Royale de Médecine, Vientiane (Laos)

Par ailleurs, notre ignorance est grande en ce qui concerne le cycle de *P. heterotremus*. Le premier hôte intermédiaire est tout à fait inconnu ; nous savons que de nombreuses espèces de mollusques d'eau douce sont les hôtes intermédiaires des autres *Paragonimus* : *Pomacea luteostoma* et *Pomatiopsia lapidaria* pour *P. kellicoti*, plusieurs *Semisulcospira*, deux *Thiara*, *Hua toucheana*, *Oncomelania nosophora* et une *Assiminea* pour *P. westermani*. Certains de ces mollusques vivent en eaux saumâtres. Le deuxième hôte intermédiaire est un crustacé d'eau douce ; si le crabe *Potamon smithianus* a été trouvé naturellement infesté en Thaïlande par *P. heterotremus*, beaucoup d'autres hôtes peuvent sans doute héberger de telles métacercaires. En Asie, elles auraient été trouvées dans des *Cambaroides*, divers *Potamon*, des *Sesarma*, un *Parathelphusa* et des *Eriocheir* dont le plus fameux est *E. sinensis* qui, vivant aussi bien en eau de mer qu'en eau douce, se rencontre aujourd'hui sur nos côtes atlantiques comme sur celles de la Méditerranée. En Amérique, *Cambarus* et *Pseudotherphusea* seraient en cause. Quant aux mammifères infestés, "réservoirs de virus", ils sont mal connus et très nombreux.

La dispersion actuelle des Laotiens ne peut que frapper l'imagination : 90.000 réfugiés se trouveraient actuellement "entransit" dans des camps thaïlandais et près de 100.000 personnes originaires du Sud-Est asiatique sont déjà établies en France. Ils connaissent d'autres pays d'accueil, les familles étant même très souvent dispersées. C'est ainsi qu'un adolescent laotien, hébergé à Nîmes, a une soeur en Australie et un frère en Russie.

Bien entendu, certaines habitudes alimentaires sont nécessaires pour que l'homme se contamine ; il s'agit, en l'occurrence, de l'absorption de crustacés insuffisamment cuits. Cependant, Coutière (1949) écrit : "les Telphuses étaient utilisées et le sont encore, frites en beignets en Italie et en Grèce". De plus, les mets dits "exotiques" et les restaurants "chinois" sont à la mode. Il est, du reste, normal que les réfugiés du Sud-Est asiatique conservent une part de leurs coutumes ; il est tout aussi souhaitable que les pays d'accueil s'enrichissent de leur apport culturel dont les Français ne sauraient exclure, justement, les appâts culinaires. Pour ce faire, sans risquer de "mondialiser" certaines distomatoses, il est nécessaire de connaître parfaitement les hôtes intermédiaires d'origine et leurs vicariants éventuels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHARMOT G., 1975. - Les distomatoses. *Rev. franç. Mal. respir.*, *3* (5) : 469-478.

CHENG T.C., 1973. - General Parasitology. Academic Press, New York and London: 965.

COUTIERE H., 1949. Le Monde Vivant. Les Editions Pittoresques, Paris, *1* : 340.

FISCHER P., 1887. - Manuel de Conchyliologie. Savy, Paris : 1369.

FONTAN R., BEAUCHAMP F. et BEAVER P.C., 1975. - Sur quelques Helminthiases nouvelles au Laos. *Bull. Soc. Pathol. exot. Paris*, *68* (6) : 557-573.

FONTAN R. et SACDPRASEUTH S., 1977. - Au Laos, l'hépoptisie parasitaire est due à *Paragonimus heterotremus*. *Méd. trop. Marseille, 37* (3) : 291-294, 3 fig.

FRANC A. - 1968. Classe des Gastéropodes. Dans : GRASSE P.P., Traité de Zoologie, Masson, Paris, *5* (3) : 1083.

HUNTER G.W., FRYE W. and SWARTZWELDER J.C., 1966. A manual of tropical medicine. Saunders, Philadelphia and London : 931.

JELLIFFE D.B., 1 970. - Diseases of children in the subtropics and tropics. In "Paragonimissis", Maled E.A. ed., London : 242-248.

SACDPRASEUTH S., LOBRY M., BOUBE G., BOUCHERON M., KERMAREC J. et PERNOD J., 1975. - La Paragonimose ou distomatose pulmonaire. *Le Poumon et le Coeur, Paris, 25* (8) : 873-885.

SACDPRASEUTH S. , COUDERT J., MOJON J. et TRAN MANH SUNG R., 1975. - La Paragonimose : étude comparative de l'affection chez l'homme et le chat. *Rev. franç. Mal. respirat., 3* (6-7) : 559-572.

Haliotis, 8, 1977.
p. 187 à 193

PRINCIPAUX GASTEROPODES VECTEURS DE TREMATODES AU TOGO (*)

par Robert Bourgat (**) et Sim-Dogou Kulo (**)

RESUME

Chacune des 10 espèces de Gastéropodes Prosobranches et Pulmonata, fréquemment récoltées au Togo sont vectrices de Trématodes ; parmi eux, *Dicrocoelium hospes*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *Matahaematoloechus exoterorchis*, *Diplodiscus subclavatum*, *Opisthorchis chabaudi* sont identifiés.

SNAILS VECTOR OF TREMATODES IN TOGOLAND

SUMMARY

All the 10 species of snails Prosobranchia and Pulmonata, often found in Togoland are vector of Trematodes ; among there, *Dicrocoelium hospes*, *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *Metahaematoloechus exoterorchis*, *Diplodiscus subclavatum*, *Opisthorchis chabaudi* are identified.

Les Mollusques (***) récoltés dans le cadre des recherches sur les cycles biologiques de Trématodes en zone tropicale sont régulièrement testés et livrent de nombreuses cercaires dont plusieurs ont permis la réalisation de cycles expérimentaux et sont donc formellement identifiées. Les premiers résultats de ces investigations concernant les Gastéropodes vecteurs de Digènes au Togo sont rassemblés ici.

PROSOBRANCHIA

- Hydrobiidae :

Gabbia neumanni (Martens) (Fig. 1) : *Opisthorchis chabaudi* Bourgat et Kulo, 1977, *O. lomeensis* Bourgat et Combes, 1975 (présumé), 2 formes de cercaires de type *virgula* non identifiées.

(*) Cette note a fait l'objet d'une "affiche" dessinée par S. Agbalo.

(**) E.D.S. (Zoologie), Université du Bénin, B.P. 1515, LOME (Togo)

(***) La détermination de la plupart des Mollusques est due à M.H. Chevallier (Museum Nat. Hist. Nat., Paris) ; les Basommatophores ont été déterminés en partie par le Prof. Mandhal-Barth (Charlottenlund, Danemark).

PULMANATA

. *Stylommatophora*

- Achatinidae :

Limicolaria aurora (Jay) (fig. 2) var. *aurora*, *L.a.* var. *tenebrica* (Reeve), *L.a.* var. *rufescens* Chevallier,

Limicolaria bourgati Chevalier (fig. 3) : *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907, *Brachylecithum* sp., *Postharmostomum* sp. (La distinction entre ces différentes formes de Limicolaires est postérieure à leur examen parasitologique ; les Helminthes signalés ici ne peuvent donc pas être attribués à une espèce en particulier).

. *Basommatophora*

- Lymnaeidae :

Lymnaea natalensis (Krauss) (fig. 4) : *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855, plusieurs xiphidiocercaires, furcocercaires et échinostomes indéterminées.

- Planorbidae :

Biomphalaria pfeifferi (Krauss) (fig. 5) : *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, plusieurs xiphidiocercaires et échinostomes indéterminées.

Gyraulus chudeaui (Germain) (fig. 6): *Metahaematoloechus exoterorchis* (Rees, 1964) (expérimental), *Gastrodiscus* sp. (expérimental).

Segmentorbis kanisaensis (Preston) (fig. 7) :*Metahaematoloechus exoterorchis* (Rees, 1964).

-Bulinidae :

Bulinus forskalii (Ehrenberg) (fig. 8) : *Schistosoma haemabium* (Bilharg, 1852), *S. bovis* (Sonsino, 1876), *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760), *Metahaematoloechus exoterorchis* (Rees, 1964) (expérimental), plusieurs Paramphistomes de Ruminants, furcocercaires, xiphidiocercaires et cercaires échinostomes indéterminées.

Bulinus truncatum rolhfsi (Clessin) (fig. 9) : plusieurs xiphidiocercaires, furcocercaires et échinostomes indéterminées.

La principale originalité est présentée par *Bulinus forskalii*, premier Bulinidae signalé comme hôte intermédiaire d'un Diplodiscinae ; mais l'ensemble de ces données sur l'helminthofaune de 10 espèces de Gastéropodes confirme la constance du rôle de vecteur tenu par ces Mollusques dont aucun ne s'est révélé jusqu'ici indemne de parasite.

REFERENCES

AMEGEE Y. et DIAW O., 1975 - Description morphologique et chétotaxique d'une cercaire de Brachylaimoidea (Trematoda) : *Cercaria* sp. ; parasite de *Limicolaria aurora* (Mollusque Achatinidae). *Bull. Mus. Nat. Hist. Nat.*, Paris, 3e série, N° 313, Zoologie, 220.

BOURGAT R. et KULO S.D., 1977 - Recherches sur le cycle biologique d'un Paramphistomidae (Trematoda) d'Amphibien en Afrique. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, *52*, *1*, p. 7-12.

BOURGAT R. et KULO S.D., 1977 - Recherches expérimentales sur le cycle biologique d'*Opisthorchis chabaudi* n. sp., description de l'adulte. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, sous presse.

BOURGAT R. et KULO S.D., 1977 - Recherches sur le cycle biologique de *Metahaematoloechus exoterorchis* (Rees, 1964), (Digenea), au Togo. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, sous presse.

BOURGAT R., SEGUIN D. et BAYSSADE-DUFOUR C., 1975 - Données nouvelles sur *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 : anatomie de l'adulte et cycle évolutif. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, *50*, 6, p. 701-714.

DOGBA K., 1976 - Présence de *Schistosoma bovis* au Togo. *Ann. Univ. Bénin*, *2*, p. 69-71.

SEGUIN D., 1976 - Considérations sur les Distomatoses hépato-biliaires des Ruminants domestiques au Togo. *Ann. Univ. Bénin*, *2*, p. 43-54.

HYDROBIIDAE

GABBIA NEUMANNI (MARTENS)





0 1cm

OPISTHORCHIS LOMEENSIS BOURGAT ET COMBES, 1975 PRESUMÉ

OPISTHORCHIS CHABAUDI BOURGAT ET KULO, 1978 2 [illegible]RCAIRES [illegible]RGULA

ACHATINIDAE





1cm

LIMICOLARIA BOURGATI CHEVALLIER

LIMICOLARIA AURORA VAR. RUFESCENS CHEVALLIER



LIMICOLARIA AURORA VAR. TENEBRICA (REEVE)



LIMICOLARIA AURORA (JAY) VAR. AURORA





DICROCOELIUM HOSPES LOOSS, 1907

POSTHARMOSTOMUM sp. *BRACHYLECITHUM* sp.

Planche I

LYMNAEIDAE

LYMNAEA NATALENSIS (KRAUSS)



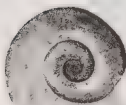


1 cm

FASCIOLA GIGANTICA COBBOLD, 1855 — XIPHIDIOCERCAIRES sp

FURCOCERCAIRES sp. — ECHINOSTOMES sp.

ANISUS CHUDEAUI (GERMAIN)





0,1cm

METAHAEMATOLOECHUS EXOTERORCHIS (REES, 1964) EXPERIMENTAL

GASTRODISCUS sp. EXPERIMENTAL

PLANORBIDAE

BIOMPHALARIA PFEIFFERI (KRAUSS)





1 cm

SCHISTOSOMA MANSONI SAMBON, 1907 | XIPHIDIOCERCAIRES sp — ECHINOSTOMES sp.

SEGMENTORBIS KANISAENSIS (PRESTON)





0,1cm



METAHAEMATOLOECHUS EXOTERORCHIS (REES, 1964)

Planche II

BULINIDAE

0.1cm

BULINUS FORSKALII (EHRENBERG)

METAHAEMATOLOECHUS EXOTERORCHIS (REES, 1964) EXPERIMENTAL [illegible] *[illegible] HAEMATOBIUM* (BILHARZ, 18[illegible])

DIPLODISCUS SUBCLAVATUS (PALLAS, 1760) *SCHISTOSOMA BOVIS* (SONSINO, 1876) PARAMPHISTOMES DE RUMINANTS

BULINUS TRUNCATUS ROHLFSI (CLESSIN)

BULINUS GLOBOSUS (MORELET)

0.1cm

[illegible]ERCAIRES sp. [illegible] ECHINOSTOMES sp.

0.1cm

XIPHIDIOCERCAIRES sp. FURCOCERCAIRES sp *ECHINOSTOMES* sp.

Planche III

Haliotis, 8, 1977.
p. 193 à 209

THE ROLE OF HEMOCYTIC HYDROLASES IN THE DEFENSE OF MOLLUSCS AGAINST INVADING PARASITES(*)

by Thomas C. Cheng(**)

SUMMARY

There is now a body of evidence that there is hypersynthesis of certain lysosomal enzymes within molluscan granulocytes as a result of both *in vitro* and *in vivo* challenge with protists and metazoan parasites. Furthermore, in general these hydrolases are released into the serum by degradulation, although this release may not occur with certain types of challenge.

An electron microscopical study involving the injection of *Bacillus megaterium* into *Biomphalaria glabrata* has revealed that the lysomomal enzymes released into serum are sufficient to cause the death and degradation of the bacteria.

It is hypothesized that the nondestruction of parasites by serum hydrolases could be due to : (1) chemical incompatibility of the enzymes with the surface of the parasites, (2) failure of the parasite to trigger release of lysosomal enzymes, and/or (3) inhibition of serum enzymes by parasite secreted substances.

LE ROLE DES HYDROLASES HEMOCYTAIRES DANS LA DEFENSE DE MOLLUSQUES VIS A VIS DES PARASITES

RESUME

D'après de nombreuses données, une synthèse augmentée de certaines enzymes lysosomales aurait lieu dans les granulocytes de mollusques au contact *in vitro* et *in vivo* avec des protistes ou des métazoaires parasites. En général ces hydrolases sont évacuées dans l'hémolymphe par des granulations bien que cette évacuation peut ne pas avoir lieu dans le cas de certains types de contact.

Une étude en microscopie électronique après injection de *Bacillus megaterium* à *Biomphalaria glabrata* a revélè que les enzymes lysosomales évacuées dans l'hémolymphe sont suffisantes pour tuer et dégrader les bactéries.

L'hypothèse est émise selon laquelle l'absence de destruction des parasites par les hydrolases de l'hémolymphe pourrait être due (1) à l'incompatibilité des enzymes avec la surface des parasites (2) l'incapacité du parasite d'induire l'évacuation des enzymes lysosomales, ou (3) à l'inhibition des enzymes par des substances secrétées par le parasite

(*) This research was supported by a grand (AI-12355-03) from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, U.S. Public Health Service.

(**) Institute for Pathobiology, Center for Health Sciences Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania 18015, U.S.A.

INTRODUCTION

When one considers resistance to parasites in vertebrate hosts, a distinction can be conveniently made between innate and acquired types. Furthermore, from what is known, the mechanisms involved are quite different. Innate resistance, by definition, does not result from previous antigenic challenge and hence generally does not have a traditional immunologic basic, i.e., does not involve immunoglobulins. On the other hand, acquired resistance generally involves the synthesis of specific immunoglobulins.

Although invertebrate immunologists have also categorized resistance as being of the innate and acquired types, these should not be confused with their counterparts in vertebrates. In fact, in spite of superficial similarities, there are fundamental differences. For example, it is now widely accepted among comparative immunologists that invertebrates do not synthesize immunoglobulins, nor have a complement system, hence if acquired resistance does occur among invertebrates, it is not based on antigen-antibody interaction.

There are some reports in molluscs. For example, Couvreur (1923) reported the occurence of a natural antitoxin in *Helix pomatia*, and Heyneman (1966) demonstrated that larval trematodes transplanted from natural host to natural host will continue to develop normally, while larvae transplanted into incompatible molluscan hosts failed to become established. Also, Tripp (1960) reported that the hemolymph of the American oyster, *Crassostrea virginica*, is cidal for certain bacteria. In subsequent studies, Tripp (1961) provided further evidence for the occurence of innate humoral bactericidal factors in the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. Bacteria inoculated into these molluscs are rapidly killed off extracellularly.

As another example of the possible existence of an innate humoral factor, Benex and Lamy (1959) reported that tissue extracts from the planorbid gastropod *Planorbis corneus* will immobilize *Schistosoma mansoni* miracidia. Based on this observation, these investigators suggested that species of snails which are refractory to schistosome infection may possess "immune-like" immobilizing substances.

Cheng et al. (1966) reported the occurrence of another type of innate immobilizing substance in molluscs. Specifically, they found that the serum of several species of marine pelecypods, especially that of *Crassostrea gigas*, will rapidly induce the ectopic immobilization and encystment of the cercariae of the echinostome *Himasthla quissetensis* and thus prevent their penetration into the second intermediate host.

The exact chemical nature of innate humoral factors in molluscs remains unknown, although Mc Dale and Tripp (1967) have shown that lysozyme occurs in the hemolymph of *C. virginica.*

Several previous workers have contributed indirect evidence which suggests that acquired resistance occurs in molluscs. For example, Barbosa and Coelho (1956) reported that *B. glabrata* previously "cured" of *S. mansoni* infection could be reinfected ; however, some cellular reaction in evoked in reinfected snails. Such reactions do not occur in initial infections. Also, Michelson (1963, 1964) reported the occurence of *S. mansoni* miracidia-immobilizing substances in tissue extracts of *B. glabrata* infected with this trematode. Also Lie *et al.* (1966, 1968) suggested that humoral factors induced by one species of larval trematodes may be responsible for what have designated as "indirect antagonism" against a second species of larval trematodes. The effects of this indirecte antagonism is that the so-called subordinate species is arrested in its development, killed, and eventually disintegrates.

The question that must be asked is : Do both innate and acquired humoral factors exist in molluscs as suggested by the indirect evidences available ? If so, what is the nature of these factors ? In order to provide answers to these questions, we have been conducting a continuous series of studies which are summarized below.

PREVIOUS STUDIES. Since cellular reactions to nonself materials in the form of phagocytosis and encapsulation are known to be the primary forms of internal defense mechanisms in molluscs (Stauber, 1950 ; Tripp, 1960, 1961 ; Feng, 1965 ; Cheng et al., 1970 ; Cheng and Rifkin, 1970 ; and others), and since morphological evidence for intracellular degradation of phagocytosed materials is available, initially we were interested in determining what enzymes occur within molluscan phagocytes and what are their biochemical and biophysical characteristics (Rodrick and Cheng, 1974a ; Cheng and Rodrick, 1974 ; Cheng, 1976).

As a result of finding lysosomes in granulocytes of different species of molluscs (Cheng, 1975 ; Yoshino and Cheng, 1976a), and discovering that these organelles are associated with intracellular degradation (Cheng and Cali, 1974 ; Cheng et al., 1974), we decided to identify the lysosomal enzymes. As a result, Cheng and Rodrick (1975) reported that β-glucuronidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, lipase, aminopeptidase, and lysozyme are associated with both the cellular and serum components of *C. virginica* and the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, and Rodrick and Cheng (1974b) found the same enzymes in *B. glabrata* hemolymph.

Our finding of these lysosomal enzymes in both cells and serum of molluscs led to the investigation of the possible origin of the enzymes in serum. Cheng et al. (1975) demonstrated that when hemocytes of *M. mercenaria* are actively phagocytosing *Bacillus megaterium in vitro*, lysozyme is released from cells into serum, and Cheng and Yoshino

(1976a), demonstrated that there is an increase in lipase activity in both the hemocytes and serum of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*, during *in vivo* phagocytosis of heat-killed *B. megaterium*. In addition, Cheng and Yoshino (1976b) investigated the possible release of lipase from hemocytes of *B. glabrata* that had been challenged *in vitro* with heat-killed and sonicated *B. megaterium* as well as with live bacteria. The results revealed that the levels of lipase activity were not altered in both hemocytes and serum of snails that had been challenged with heat-killed and sonicated bacteria ; however, there was a significant elevation of lipase activity in both the cells and serum that had been challenged with live bacteria. This and previous findings have allowed the tentative conclusion that the hypersynthesis of certain lysosomal enzymes within molluscan phagocytes and their subsequent release into serum during active phagocytosis is only induceable by whole bacteria, either heat-killed or live, but not by sonicated ones.

Yoshino and Cheng (1976b) studied alterations in the levels of aminopeptidase activity in both the hemocytes and serum of the American oyster, *C. virginica*, after *in vitro* exposure to heat-killed *B. megaterium*. They reported that there was a significant elevation in intracellular aminopeptidase activity induced by the challenge ; however, there was no increase in the activity of this enzyme in the serum. These data suggest that aminopeptidase is not released into serum by hemocytes of *C. virginica* during phagocytosis although the bacterial challenge did stimulate hypersynthesis of this enzyme within hemocytes. This finding is interesting since Cheng et al. (1978) have since demonstrated that there are significant increases of aminopeptidase activity in the serum of *B. glabrata* at 20 and 30 days after exposure to irradiated *Echinostoma lindoense* miracidia. Thus it would apprear that the release of aminopeptidase from molluscan hemocytes into serum is induceable by certain types of antigenic challenge and not by others. Whether this phenomenon holds for other lysosomal enzymes remains to be tested.

Along similar lines, Cheng et al. (1977) ascertained the levels of lysozyme activity in both the cells and serum of *B. glabrata* at 1,2, and 4 hours post-injection of heat-killed *B. megaterium*. They found that there is a significant increase in the lysozyme level in hemocytes at 1 hour post-challenge, and significant increases in the serum fraction at 2 and 4 hours post-challenge. Again, these data indicate that challenge with *B. megaterium* induces the hypersynthesis of lysozyme within phagocytes initially and the enzyme is subsequently released into serum.

We have asked the question : how are lysosomal enzymes released into serum ? Foley and Cheng (1977) have provided the answer. By empolying granulocytes of *M. mercenaria*

as the model, they have demonstrated that degranulation occurs during phagocytosis and this process represents the morphological basis for enzyme release from the cytoplasmic granules, which are true lysosomes (Yoshino and Cheng, 1976a).

Having established that the overall pattern of enzyme activity during phagocytosis involves stimulation by certain antigens which results in the hypersynthesis of lysosomal enzymes and their subsequent release by the process of degranulation into serum, the question had to be asked as to whether the serum enzymes serve a function relative to immunity ?

To date, only the antimicrobial property of one lysosomal enzyme, lysozyme, is known. McDale and Tripp (1967) reported that this hydrolase from the hemolymph of the oyster *C. virginica* will lyse certain Gram-positive bacteria, specifically *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis*. In addition, Rodrick and Cheng (1974a) demonstrated that the lysozyme of *C. virginica* will lyse *Escherichia coli*, *Gaffkya tetragena*, *Salmonella pullorum* and *Shigella sonnei* in addition to *B. subtilis* and *B. megaterium*. It has no effect on *Staphylococcus aureus*. Also, Cheng and Rodrick (1974) reported that the lysozyme of *Mya arenaria* will lyse *M. lysodeilticus*, *B. megaterium*, *Proteus vulgaris*, *S. pullorum*, *S. sonnei*, *B. subtilis*, and *E. coli*, but also has no effect on *S. aureus*. Such information has been obtained by assaying for the breakdown products of these bacteria.

We have now conducted studies to determine whether the increased levels of lysosomal enzymes in the serum of *B. glabrata* have any effect on bacteria and certain helminths. These studies are reported below.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial injections and controls. The specimens of *B. glabrata* employed were of the so-called NIH albino strain (Newton, 1955). Each measured 6-8 mm in shell diameter. All of the snails were maintained as previously described (Harris and Cheng, 1975).

Snails of the experimental group, consisting of 40 specimens, were divided into two equal subgroups. Each snail of one subgroup was injected through the shell (into the visceral region with 5 µl of aqueous suspension of heat-killed *B.megaterium* at a concentration of 80×10^6 bacteria/ml. The members of the second subgroup were injected with a same amount of bacterial suspension into the sole of the foot.

One set of controls, consisting of 40 snails, was sham-injected, with 20 punctured in the visceral mass and the remaining 20 in the fooot. A second set of controls, consisting of 20 snails, was not manipulated.

Preparation of serum. Two hours after the snails of the experimental group were challenged, hemolymph samples were collected intracardially from each by the method of Cheng and Yoshino (1976b). Similarly, hemolymph samples were collected from the two groups of control snails. The hemolymph samples from each group or subgroup were pooled, subjected to centrifugation at 400 g of 10 minutes in a Sorvall RC2-B refrigerated centrifuge at -5°C to separate the cells from the serum.

After the serum had been decanted from the cells, 20 x 10^6 live vegetative cells of *B. megaterium* that had been thoroughly washed were placed in each category of serum. In addition, a same concentration of fresh *B. megaterium* was placed in a 0.023 g/liter solution of pure lysozyme (Muramidase, Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.). Also, a same concentration of live *B. megaterium* was placed in a 0.07 M NaCl solution.

All of the bacterial suspensions were suspended in the respective sera, enzyme, or salt solutions for 8 hours with intermittent agitation after which each preparation was centrifuged at 400 g for 10 minutes at -5°C to pellet the bacterial cells.

The bacteria were then fixed with 0.075 cacodylate-buffered 6 % glutaraldehyde, pH 7.45, for 1 hour, followed by several washings in cold buffer for a total of 2 hours. The bacteria were then post-fixed in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer for 3 hours, starting at 5°C, but permitting it to warm up to room temperature during the fixation process. This was followed by washing in cold buffer for four additional times, 5 minutes each, followed by dehydration in an ascending ethanol series. Propylene oxide was employed as the final dehydrant at room temperature for two 20 - minutes washings.

The cells were subsequently embedded in a 1 : 1 mixture of Spur's Epon and propylene oxide, and eventually transferred to pure Epon. Subsequently, the preparation was centrifuged at 800 g for 10 minutes to form a cell pellet, which was permitted to polymerize at 70°C for 10 hours. The sections were cut on a Porter-Blum MT-2 ultramicrotome, stained for 15 minutes with uranyl acetate, followed by 1 minute with lead citrate. They were examined in a Hitachi HS-8 electron microscope.

RESULTS

Unchallenged controls. Vegetative cells of *B. megaterium* that had been exposed to 0.07 M NaCl solution showed no abnormalities (Fig. 1). Their walls are intact as is the enclosed protoplasm. Certain cells portray more or less completely developed centripetally oriented transverse cell walls (Fig. 1) as well as low-density fibrous component of the nuclear apparatus surrounding dense nuclear material.

Sham-injected controls. *B. megaterium* that had been exposed to the sera of sham-injected snails are essentially normal in appearance at the EM level (Fig. 2). The cell wall is intact as is the cytoplasm. This indicates that sham-injection had not induced the release of sufficient lysosomal enzymes, if any, to affect the bacteria.

Untampered controls. As is the case with bacteria that had been exposed to salt solution and the serum of sham-injected snails, no alterations were noticed in *B. megaterium* that had been exposed to the serum of untampered *B. glabrata* (Fig. 3).

Experimentals. Rather dramatic alterations were observed with *B. megaterium* that had been exposed to the serum of *B. glabrata* which had been challenged with heat-killed *B. megaterium in vivo*. Specifically, there is erosion of the cell wall, and almost total leaching of the cytoplasm and nuclear material (Fig. 4). In some instances where a centripetally oriented divisional cell wall had formed, presumably prior to exposure to the serum, the constituent material gives the appearance of having remained intact.

Lysozyme-treated controls. The most dramatic changes associated with *B. megaterium* were observed in those bacteria that had been exposed to pure lysozyme at a concentration of 0.023 g/liter for 8 hours. In these, although much of the cell walls retained their shape, enzyme-eroded areas are conspicuous and abundant (Fig. 5). Furthermore, the cell contents, both cytoplasm and nuclear material, were no longer apparent. In their place, the intracellular spaces were lucid and empty.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

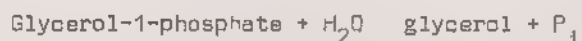
From the electron microscopical evidence presented, it is apparent that the elevated levels of certain lysosomal enzymes in *B. glabrata* serum are sufficient to affect *B. megaterium*, causing their death and degradation. It is noted that attempts to culture *B. megaterium* that had been exposed to the sera of pre-challenged snails or to pure lysozyme on nutrient agar were unsuccessful. Thus, it is concluded that the elevated lysosomal enzyme levels in pre-challenged snails are bactericidal.

There is little doubt that the destruction of bacteria by induced elevations in the levels of lysosomal enzymes is not as specific as that resulting from immunogen-immunoglobulin interaction. However, as stated later, the surface of the exposed bacterium must contain a chemically compatible substrate.

Because of the nature of this colloquium, I am taking the liberty of sharing some hypotheses with you. Specifically, I wish to direct my remarks at the possible roles of lysosomal enzymes that occur in molluscan hemocytes relative to metazoan parasites.

As a result of the studies by McDale and Tripp (1967), Rodrick and Cheng (1974a), Cheng and Rodrick (1974), and the data presented herein, a pattern is evolving, i.e., elevated levels of lysosomal enzymes in molluscan serum can serve as defense molecules against susceptible microorganisms. Since it has been suggested (Cheng and Rifkin, 1970) that encapsulation of helminth parasites, or granuloma formation, actually represents aborted attempts at phagocytosis of foreign particles too large to be engulfed, the question should be raised as to what mechanisms underlie the fact that certain encapsulated metazoan parasites, such as incompatible schistosome larvae, are destroyed, while others, such as the metastrongylid nematode *Angiostrongylus cantonensis*, are not ? Furthermore, what is the basis for the encapsulation and subsequent destruction of certain strains of *S. mansoni* in incompatible strains of *B. glabrata* ?

It is known as a result of the work of Harris and Cheng (1975), Cheng and Garrabrant (1977), and Cheng (1978) that there is an accumulation of acid phosphatase in the granulocytes comprising the helminth-encapsulating granuloma. Phosphatases are hydrolytic enzymes which catalyze the hydrolysis of phosphoric esters :



Glycerol-1-phosphate + H_2O glycerol + P_i

Acid phosphatase, a widely recognized lysosomal marker enzyme, hydrolyzez a variety of phosphoric esters at an acid pH. As Harris and Cheng (1975) have demonstrated, there is diffusion of this enzyme from granuloma-comprising capsules surrounding *A. cantonensis* larvae, yet the parasite is unaffected. This suggests that the susceptible phosphoric esters, at least in the exposed configuration, are not available and hence the hydrolase has no deleterious effect. Relative to this thesis, it is recalled that Ubelaker et al. (1970) have found that when hemocytes (granulocytes) of the beetle *Tribolium confusum* make contact with cysticercoids of the cestode *Hymenolepis diminuta*, some of the host cells are ruptured, undoubtedly releasing enzymes ; yet the helminths are not damaged. This, again, may be an example of the absence of a suitable substrate.

Thus one postulation as to why elevated serum hydrolases do not affect certain nonself substances is the absence of vulnerable substrates on their surfaces (Fig. 6).

The second possibility is that the release of lysosomal enzymes from their sites of synthesis, i.e., granulocytes and other sources (Yoshino and Cheng, 1977), must be triggered by some component of the parasite's somatic antigens and/or secretions. If such a triggering molecule(s) is absent, then one would not expect the release of enzymes, at least to deleterious levels, and the encapsulated parasite is not affected (Fig. 6). Such may be the case with *S. mansoni* sporocysts in compatible *B. glabrata*.

A third possibility exists. It is possible that anti-enzymes are elaborated by the encapsulated parasite which inactivates the lytic enzyme (Fig. 6). This remains to be investigated.

In summary, there is now a body of evidence that there are acquired "humoral" protective molecules in molluscs which may have direct protective functions, but these are not chemically immunoglobulins or opsonins. These are lysosomal enzymes released primarily from granulocytes and which are limited in their specificity. It is possible that these molecules are responsible, at least in part, for the bactericidal properties of molluscan sera and extracts that have been reported.

It needs to be emphasized that lysosomal enzymes do occur at a lower level in the serum of naive molluscs. Apparently the levels in such molluscs are insufficient to prevent the invasion and establishment of compatible parasites. For example, Lie et al. (1975) have found that juvenile albino *B. glabrata*, which are normally susceptible to *Echinostoma lindoense*, are capable of developing acquired resistance. Specifically, when susceptible snails are exposed to irradiated *E. lindoense* miracidia, the resulting sporocysts are destroyed in the snail's ventricle by hemocytic capsules and the snails become resistant to subsequent challenge with nonirradiated miracidia of the same species. Furthermore, Lie and Heyneman (1976) have reported that sensitized snails may be resensitized by exposing them to a large number of normal miracidia. Such snails develop a higher degress of resistance than those that had been sensitized only once. Working in collaboration with Lie and Heyneman, Cheng et al. (1978) have demonstrated that the level of serum aminopeptidase activity is significantly elevated in *B. glabrata* that had been exposed to irradiated *E. lindoense* miracidia. Although the direct effect of aminopeptidase on parasites comprising a subsequent challenge has not yet been determined, in view of what is known about the action of this enzyme, i.e., the hydrolysis of glycyl-l, glycyl-D, and glycyl-dehydroamino acids (Robinson et al., 1953), it is possible that it could bring about the breakdown of proteins in the tegument of larval trematodes if the compatible substrates occur.

Finally, it is noted that there are other soluble molecules in molluscan hemolymph, such as agglutinins, which are known to play a role in enhancing phagocytosis.

ACKNOWLEDGMENTS

I wish to acknowledge the technical assistance of Douglas R. Keene during the preliminary stages of this study, and to my son, J. Bradford Cheng, for his expert assistance with photography.

REFERENCES

BARBOSA F.S., and COELHO M.V., 1956 - Pesquisa de immunodade adquirida homologa em *Australorbis glabratus*, nas infestacoes por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Malar.*, *8*, 49-56.

BENEX, J., and LAYM L., 1959 - Immobilisation des miracidiums de *Schistosoma mansoni* par des extraits de planorbes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, *52*, 188-193.

CHENG T.C., 1975 - Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *266*, 343-379.

CHENG T.C., 1976 - Beta-glucuronidase from the serum and cells of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* (Mollusca : Pelecypoda). *J. Invert. Pathol.*, *27*, 125-128.

CHENG T.C., 1978 - The possible roles of acid phosphatases and other hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge. *Comp. Pathobiol.*, In press.

CHENG T.C. and CALI A. 1974 - An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytized by granulocytes of *Crassostrea virginica*. *Contemp. Top. Immunobiol.*, *4*, 25-35.

CHENG T.C. and GARRABRANT T.A., 1977 - Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *Intl. J. Parasitol.*, *In Press*.

CHENG T.C., and RIFKIN E., 1970 - Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. In "Diseases of Fish and Shellfish." *Am. Fisher. Soc. Symp.* *5*, 443-496.

CHENG T.C. and RODRICK G.E., 1974 - Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Biol. bull.*, *147*, 311-320.

CHENG T.C. RODRICK G.E., 1975 - Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *52B*, 443-447.

CHENG T.C. and YOSHINO T.P., 1976a - Lipase activity in the serum and hemolymph cells of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*, during phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, *27*, 243-245.

CHENG T.C. and YOSHINO T.P., 1976b - Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacterial lipids. *J. Invert. Pathol.*, *28*, 143-146.

CHENG T.C., SHUSTER C.N. Jr., and ANDERSON A.H., 1966 - Effects of plasma and tissue extracts of marine pelecypods on the cercaria of *Himasthla quissetensis*. *Exptl. Parasit.*, *19*, 9-14.

CHENG T.C., THAKUR A.S. and RIFKIN E. 1970 - Phagocytosis as an internal defense mechanism in the Mollusca : with an experimental study of the role of leucocytes in the removal of ink particles in *Littorina scabra* Linn. In "Symposium on Mollusca". *Marine Biol. Assoc. India*, pp. 546-563.

CHENG T.C. CALI A. and FOLEY D.A. 1974 - Cellular reactions in marine pelecypods as a factor influencing endosymbioses. In "Symbiosis in the Sea". (W.B. Wernberg, ed.). Univ. South Carolina Press, Columbia, S.C. pp. 61-91.

CHENG T.C. RODRICK G.E. FOLEY D.A. and LOEHLER S.A. 1975 - Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, *25*, 261-265.

CHENG T.C. CHORNEY M.J. and YOSHINO T.P., 1977 - Lysozyme-like activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. *J. Invert. Pathol.*, *29*, 170-174.

CHENG T.C., LIE K.J., HEYNEMAN D. and RICHARDS C.S. 1978 - Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *J. Invert. Pathol.*, *In press*.

COUVREUR E. 1923 - Quelques points relatives à la question de l'immunité chez les invertébrés. In "Céléb. 75e Anniv. Fond. Soc. Biol." pp. 120-123.

FENG S.Y. 1965 - Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. *Biol. Bull.*, *128*, 95-105.

FOLEY D.A. and CHENG T.C., 1977 - Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, *29*, 321-325.

HARRIS K.R. and CHENG T.C., 1975 - The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis* : enzyme histochemistry. *J. Invert. Pathol.*, *26*, 367-374.

HEYNEMAN D. 1966 - Successful infection with larval echinostomes surgically implanted into the body cavity of the normal snail host. *Exptl. Parasit.*, *13*, 220-223.

LIE K.J. and HEYNEMAN D. 1976 - Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, *62*, 51-58.

LIE K.J. BASCH P.F. and UMATHEVY T., 1966 - Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaya. XII. Antagonism between two species of echinostome trematodes in the same lymnaeid snail. *J. Parasitol.*, *52*, 454-457.

LIE K.J. BASCH P.F. HEYNEMAN D. BECK A.J. and AUDY J.R., 1968 - Implications for trematode control of interspecific larval antagonism within snail hosts. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, *62*, 299-319.

LIE K.J. HEYNEMAN D. and LIM H.K., 1975 - Studies on resistance in snails : specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria* snails. *Intl. J. Parasit.*, *5*, 627-631.

McDALE J.E. and TRIPP M.R. 1967 - Lysozyme in the hemolymph of the oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.*, *9*, 531-535.

MICHELSON E.H., 1963 - Development and specificity or miracidial immobilizing substances in extracts of the snail *Australorbis glabratus* exposed to various agents. *Ann. N.Y. Acad. 113*, 486-491.

MICHELSON E.H. 1964 - Miracidia-immobilizing substances in extracts prepared from snails infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *13*, 36-42.

NEWTON W.L., 1955 - The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which combines albinism with high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, *41*, 526-528.

ROBINSON D.S. BIRNHBAUM S.M. and GREENSTEIN J.P. 1953 - Purification and properties of an aminopeptidase from kidney cellular particulates. *J. Biol. Chem.*, *202*, 1-26.

RODRICK G.E. and CHENG T.C. 1974a - Kinetic properties of lysozyme from *Crassostrea virginica* hemolymph. *J. Invert. Pathol.*, *24*, 41-48.

RODRICK G.E. and CHENG T.C. 1974b - Activities of selected hemolymph enzymes in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Invert. Pathol.*, *24*, 387.

STAUBER L.A., 1950 - The fate of india ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica* Gmelin. *Biol. Bull.*, *98*, 227-241.

TRIPP M.R. 1960 - Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.*, *119*, 273-282.

TRIPP M.R. 1961 - The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, *47*, 745-751.

UBELAKER J.E. COOPER N.B. and ALLISON V.F. 1970 - Possible defensive mechanism of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids to hemocytes of the beetle *Tribolium confusum*. *J. Invert. Pathol.*, *16*, 310-312.

YOSHINO T.P. and CHENG T.C. 1976a - Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, *95*, 215-220.

YOSHINO T.P. and CHENG T.C. 1976b - Experimentally induced elevation of aminopeptidase activity in hemolymph cells of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.*, *27*, 367-370.

YOSHINO T.P. and CHENG T.C. 1977 - Aminopeptidase activity in the hemolymph and body tissues of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, *30*, 76-79.

LEGENDS

Fig. 1 - Electron micrograph of *Bacillus megaterium* after exposure to 0.07 M NaCl for 8 hr. Notice unaltered cell wall (W), centripetal cell wall (CW) which indicates division, dense nuclear apparatus (DN), and normal appearing cytoplasm. X 33 000.

Fig. 2 - Electron micrograph of *B. megaterium* after exposure to serum of sham-injected *Biomphalaria glabrata* for 8 hr. Notice unaltered cell wall and normal appearance of cell. X 30 000.

Fig. 3 - Electron micrograph of *B. megaterium* after exposure to serum of untampered *B. glabrata* for 8 hr. Notice normal appearance of cell. X 30 000.

Fig. 4 - Electron micrograph of *B. megaterium* after exposure to serum of *B. glabrata* which had been previously challenged with *B. megaterium*. Notice occurrence of eroded wall (W) and totally degraded inclusions. X 26 000.

Fig. 5 - Electron micrograph of *Bacillus megaterium* after exposure to 0.023 g/liter of pure lysozyme. Notice disruption of cell wall and empty cell. X 15 000.

Fig. 6 - Diagram showing possible mechanisms which may be responsible for the nondestruction of metazoan parasites by lysosomal enzymes originating in molluscan granulocytes.

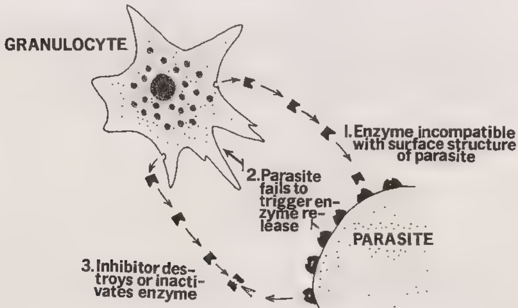
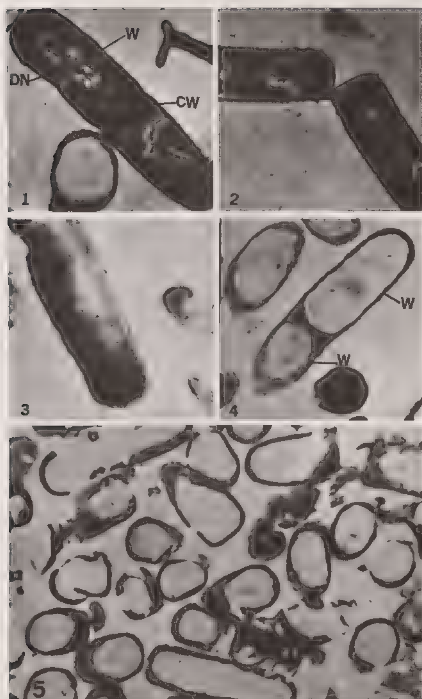


Figure 6


W
DN
CW
1
2
3
W
W
4
5

Haliotis, 8, 1977.
p. 209 à 215

DIFFERENCIATION *IN VITRO* DES CELLULES IMPLIQUEES DANS LA DEFENSE DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* A L'INFESTATION PARASITAIRE.

par Jacqueline Bénex(*)

RESUME

Dans le cadre de nos recherches relatives à la réponse cellulaire de *Biomphalaria glabrata* à une infestation par *Schistosoma mansoni* nous avons dans ce travail cherché à isoler en culture l'organe producteur d'amoebocytes décrit par Lie K.J. et Heyneman D. en 1976 et suivre *in vitro* la survie, la prolifération et la différenciation des cellules y trouvant leur origine, afin d'en établir la signification dans la défense des planorbes ~ parasitisme. Trois techniques de culture ont été utilisées : des explants, des cultures cellulaires obtenues après trypsinisation, les résultats d'une désintégration mécanique. Dans les première et seconde conditions expérimentales deux types de cellules s'individualisent et prolifèrent ; fibroblaste, amoebocyte avec cependant des formes de transition. La troisième méthode n'a pas conduit à de bons résultats. Les cellules ainsi obtenues sont capables *in vitro* d'encapsuler un miracidium ou un métasporocyste, mais la preuve d'une réaction immunologique reste à apporter.

DIFFERENCIATION *IN VITRO* OF CELLS CONCERNED IN THE DEFENSE OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* AGAINST PARASIT CONTAMINATION

SUMMARY

We wanted to isolate in culture the producing amoebocyte organ described by Lie K.J. and Heyneman D. (1976) and watch *in vitro* the life, the proliferation and the differenciation of the cells originating there from with a view of determining its meaning in the defense of planorbes against parasits. Cellular experimental *in vitro* cultures were carried out according to three methods : cultures starting from explants, cells obtained after trypsic digestion, simple dissociation of tissues by mechanical means.

INTRODUCTION

Poursuivant notre étude relative à l'expression de la réponse cellulaire des mollusques *Biomphalaria glabrata* à une infestation parasitaire par *Schistosoma mansoni* nous nous sommes intéressée aux travaux rapportés récemment (1976) par Lie et Heyneman montrant la présence chez ces planorbes d'un organe qui serait à l'origine de la production d'amoebocytes en nombre important, lors d'une infestation parasitaire. Nous avons voulu isoler en culture cet organe et suivre *in vitro* la survie, la prolifération et la

(*) Service Biochimie des Antigènes, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75015 PARIS.

différenciation des cellules y trouvant leur origine, afin d'en établir la signification dans la défense au parasitisme.

Une étude histologique préliminaire a été nécessaire afin de bien localiser l'organe en question (fixation au formol isotonique à 10 %, coloration hemalun-eosine ou hematoxyline ferrique au dioxane). Celui-ci à l'état quiescent, chez la planorbe saine, est très peu visible ; il ne se développe que sous le stimulus de l'infestation. Il est matérialisé par l'existence de groupes de cellules s'étalant le long de la bordure épithéliale de la cavité postérieure du manteau adjacente au péricarde et à la partie saculaire du rein.

Dans une deuxième étape expérimentale des cultures cellulaires *in vitro* ont été réalisées. Sous loupe binoculaire et en atmosphère stérile on détache les structures constituant l'organe producteur d'amoebocytes. On les rince dans du milieu de survie additionné d'antibiotiques, et on les explante selon trois modalités :

1. culture à partir d'explants ; de petits fragments sont découpés et mis en survie.

2. cellules obtenues après digestion trypsique : les fragments sont traités par une solution de trypsine à 0,25 % en solution physiologique isotonique au milieu interne des planorbes à pH 7,2-7,4 20 à 30 minutes à la température du laboratoire. La solution de trypsine peut également être remplacée par une solution de pronase à 0,2 % pendant 5 à 10 minutes.

3. Désagrégation simple du tissu par un moyen mécanique : les tissus prélevés sont passés dans un boyeur de Dounce ou de Potter. Le broyat est récupéré dans du milieu de survie, centrifugé et la population cellulaire obtenue mise en culture.

Les enceintes de culture sont soit des tubes de Leighton, soit de petits flacons de Falcon. Le milieu de culture utilisé est le même pour toutes les catégories de cellules. Il est basé sur les considérations qui nous avaient conduite à proposer un milieu synthétique lors de nos premiers essais de culture de tissus de planorbes. Pour plus de commodité il fait appel aux produits trouvés dans le commerce, au lieu d'être entièrement préparé par nous-même au laboratoire. Il comprend : Milieu de Schneider pour Drosophila, 200 ml ; hydrolysat de lactalbumine 2,5 g/l, 90 ml ; sérum de veau foetal inactivé, 100 ml ; solution acides aminés (Eagle), 30 ml ; solution vitamines (Eagle), 2 ml ; galactose, 1,5 g ; solution physiologique isotonique q.s.p. 1.000 ml + par ml Pénicilline, 100 U., Colimycine, 100 µg, Gentamicine, 10 µg - température 25/27° sous atmosphère 5 % CO_2. Changement de milieu tous les 2 à 3 jours.

RESULTATS

A partir des explants on voit rapidement se détacher et proliférer deux types de cellules : fibroblastes et amoebocytes. On assiste dans les 2/3 jours à une migration cellulaire importante, avec l'apparition de formes qui, morphologiquement, semblent être des formes de transition entre fibroblastes et amoebocytes. Ces cellules possèdent un noyau volumineux, un cytoplasme fortement basophile et de nombreuses granulations également basophiles. Parmi cette population cellulaire, une partie se fixe sur le fond de la boite de culture ; les autres restent en solution et de ce fait, sont éliminées au cours du renouvellement du milieu.

Dans le cas où l'on cultive le résultat d'une simple désagrégation tissulaire dans un homogénéisateur, on obtient une population cellulaire assez considérable dans laquelle on retrouve les fibroblastes et les amoebocytes précédents ; mais, en outre, on identifie de nombreuses cellules type épithéliale de forme polygonale et un assez grand nombre de cellules type lymphocyte. Toutes ces cellules dégénèrent assez vite.

Après trypsinisation de l'organe, les populations cellulaires obtenues se rapprochent de celles qui migrent hors de l'explant : fibroblastes et amoebocytes. Les cellules fibroblastiques ont un gros noyau, un cytoplasme granuleux et présentent de grandes extensions cytoplasmiques. Les amoebocytes sont plus arrondis avec un noyau ovale et possèdent souvent des vacuoles et grains de pigment. Ils ont tendance à se réunir pour former des aggrégats difficilement dissociables.

DISCUSSION

Il est incontestable qu'à partir des tissus décrits par Lie et Heyneman on peut obtenir en culture des types cellulaires similaires à ceux jouant un rôle dans la défense du mollusque à une agression parasitaire.

Mais dans quelle mesure l'action de ces cellules a-t-elle un support immunologique ? Certains faits le laissent à penser.

Ainsi, dès 1956, Barbosa mettait en évidence l'existence d'une immunité cellulaire chez les planorbes. Celles-ci, bien que susceptibles à *Schistosoma mansoni* présentent lors d'une deuxième infestation une réaction tissulaire plus ou moins importante qui conduit à l'encapsulation par les amoebocytes et les fibroblastes,

Les amoebocytes des gastéropodes attaquent les xenogreffes et non les allogreffes (Tripp, 1961 - Chang et Galloway, 1970). La population des amoebocytes circulants augmente dans des proportions notables à la suite d'une infestation parasitaire.

Parallèlement à ces constatations, nous avons pu vérifier que l'organe producteur d'amoebocytes décrit par Lie et Heyneman n'était réellement identifiable que chez les individus parasités. D'autre part, la prolifération de cet organe est d'autant plus grande que le mollusque est moins susceptible. C'est dans le cas où une réaction tissulaire a lieu au site de pénétration du miracidium que la multiplication cellulaire au niveau de l'organe est la plus importante.

Afin de tester, dans une première approximation, la réactivité de ces cellules, nous avons introduit dans des flacons où la culture était bien établie depuis plusieurs jours, soit :

1. des miracidiums fraîchement éclos : tant que ceux-ci demeurent mobiles et actifs aucune réaction n'apparaît. Mais lorsqu'ils s'immobilisent les amoebocytes les entourent et se fixent à leur surface. Néanmoins il ne semble pas qu'il s'agissent de phagocytose réelle mais de simple adhérence.

2. des métasporocystes : dans nos conditions expérimentales actuelles ceux-ci survivent mal, La sortie des cercaires bien qu'immatures, est précoce et le sac sporocytaire dégénère. A ce moment également, il y a afflux d'amoebocytes qui viennent adhérer à la surface de la membrane du sporocyste.

Mais le problème est de savoir si cet attachement n'est qu'un aspect de l'élimination d'un corps étranger quel qu'il soit ou s'il intervient un facteur immunologique avec reconnaissance spécifique. Nous ne pouvons, pour le moment, répondre à cette question ; nous espérons que des expériences en cours nous permettront de trancher.

Quoi qu'il en soit, il paraît maintenant sûr qu'une certaine immunité cellulaire (à défaut d'immunité humorale) existe chez les mollusques. Celle-ci peut être innée ou acquise, mais est surtout proportionnelle au degré d'adaptation du parasite à son hôte invertébré.

REFERENCES

BASCH P.F. et DICONZA J.J., 1973 - Primary cultures of embryonic cells from the snail *Biomphalaria glabrata*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *22*, N°6, 805-813.

BAYNE C.J., 1968 - Molluscan organ culture. *Malacol. Reviews*, *1*, 125-135.

BENEX J., 1966 - Les possibilités de la culture organotypique en milieu liquide dans l'étude des problèmes parasitaires. I. La culture organotypique en milieu liquide d'explants de Planorbes. *Ann. Paras. Hum. Comp.*, *41*, 351-378.

CHENG T.C. et ARNDT R.J., 1973 - Maintenance of cells of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) *in vitro*. *J. Invert. Path.*, *22*, 308-310.

CHENG T.C., 1964 - Maintenance *in vitro* of larval *Schistosoma mansoni* in tissues from the snail *Australorbis glabratus*., *J. Parasitol.*, *50*, 531-545.

FLANDRE O., 1971 - Cell culture of mollusks. In "Invertebrate Tissue Culture", vol. 1, 361-383. (C. Vago ed.), Academic Press, New-York.

HANSEN E.L., 1974 - A cell line from the fresh water snail *Biomphalaria glabrata*. *Int. Res. Commun. Systems*, *2*, 1703.

LIE K.J. et HEYNEMAN D., 1975 - Studies on resistance in snails : A specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int. J. Parasitol.*, *5*, 621-626.

LIE K.J. et JEONG K.H., 1976 - Studies on resistance in snails : 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amoebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata*. *J. of Parasitol.*, *62*, 286-291.

VAGO C. et CHASTANG S. , 1958 - Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'invertébrés. *Experimentia*, *14*, 110-111.

Haliotis , 8, 1977 (1979)
p. 215 - 241

LA SEXUALITE DES MOLLUSQUES GASTEROPODES ET LES TREMATODES PARASITES. APPORT DE L'ENDOCRINOLOGIE DE LA SEXUALITE DES GASTEROPODES A L'ETUDE ET A L'INTERPRETATION DES CONSEQUENCES DU PARASITISME

par Jacques LE BRETON[+]

RESUME

L'auteur expose les résultats essentiels acquis dans le domaine du contrôle endocrine de la sexualité des Mollusques Gastéropodes. Il souligne leur importance pour la compréhension de certains effets du parasitisme des Trématodes. Il en ressort deux idées essentielles :

- les formes larvaires peuvent exercer une activité sur le contrôle endocrine.
- l'action des Trématodes sur la sexualité résulte des interactions des deux cycles évolutifs du Mollusque et du parasite. Elle est variable et peut être l'objet d'interprétations contradictoires.

L'auteur analyse les questions que soulève son étude expérimentale en se référant au Mollusque Prosobranche *Littorina littorea* L.

THE SEXUALITY OF GASTROPOD MOLLUSCS AND THE TREMATODE PARASITES. CONTRIBUTION OF THE SEXUAL ENDOCRINOLOGY OF GASTROPODS TO THE STUDY AND THE INTERPRETATION OF THE PARASITISM-INDUCED CHANGES.

SUMMARY

The author expounds the main results obtained in the field of the Gastropod sexuality endocrine control and emphasizes on their importance for the comprehension of Trematode parasitism-induced changes. Two main ideas come out;

- larval stages can exert an activity on the endocrine controle.
- the Trematode action on sexuality results from the interaction of the two evolutive cycles, the one from the Molluscs, the other from the parasite. Then it may vary and may lead to conflicting interpretations.

The author analyses the problems arising from its experimental study with reference to the Prosobranch species *Littorina littorea* L.

(+) Laboratoire de Zoologie, Université, 14032-Caen cédex.
Station maritime, 14530 - Luc-sur-Mer (France).

INTRODUCTION

De nombreuses anomalies de la sexualité ont été observées chez les Mollusques Gastéropodes infestés par des larves de Trématodes digénétiques. Il s'ensuit généralement une castration plus ou moins complète accompagnées d'une réduction des voies génitales.

L'activité des différentes formes larvaires et les mécanismes mis en cause dans le Mollusque sont encore très mal connus. Les connaissances actuelles se limitent, pour la plupart, à des analyses cytologiques et biochimiques de leurs effets. Pour ce qui est des modalités de l'action parasitaire on en est réduit pour l'instant à des hypothèses qu'aucun travail expérimental n'est encore venu confirmer.

D'autre part, les recherches réalisées ces dix dernières années sur la sexualité des Mollusques Gastéropodes ont mis en évidence un contrôle endocrine qui s'exerce sur la morphogénèse et sur le fonctionnement des différents éléments de l'appareil génital. Le parasite pouvant, à priori, modifier l'équilibre endocrinien, ses effets se prêtent à des analyses nouvelles.

Il en résulte que l'étude expérimentale de l'action des Trématodes sur l'appareil génital des Gastéropodes est complexe du fait de la multiplicité des facteurs qui interfèrent.

LE PARASITISME

1. Les effets du parasitisme

a. Sur la gonade. Depuis Garnault (1889) de nombreux cas de castration ont été décrits chez les Mollusques Gastéropodes.

Cependant l'infestation ne se traduit pas toujours par une simple destruction de la gonade. Ainsi Wesenberg-Lund (1931) observe que *Leucochloridium paradoxum* masculinise le Pulmoné *Succinea putris* avant de le castrer. Chez *Calyptraea sinensis* (hermaphrodite protandre) des rédies entraînent une sexualisation femelle des individus en phase mâle : la spermatogénèse s'épuise et de nombreux ovocytes apparaissent avant que ne s'opère la castration complète (Féral, Le Breton et Streiff, 1972).

b. Sur le tractus génital. De nombreuses observations font état d'une réduction plus ou moins marquées du tractus génital en même temps que la gonade disparaît.

Il arrive cependant que le pénis ne régresse pas comme chez *Bithynia tentaculata* (Neuhaus, 1940) et *Hydrobia* (Ankel, 1962) ou bien encore que le tractus génital entier reste inchangé [*Biomphalaria glabrata (Taphius glabratus)*, Harry, 1965 ; *Nassarius obsoletus*, Cheng, Sullivan et Harris, 1973]. Enfin il est des cas, chez *Hydrobia (Peringia) ulvae*, où

un pénis apparaît sur des femelles parasitées (Krull, 1935 ; Rothschild, 1938). Mattox en 1938 pense qu'une masculinisation semblable transforme le tentacule droit des femelles de *Campeloma rufum* en une structure identique à celle du pénis.

2. L'activité parasitaire et ses conséquences

a. Sur la gonade. Les larves de Trématodes peuvent exercer une activité mécanique ou chimique.

1) L'activité mécanique peut être la succion. Ce mode est réservé aux rédies qui sont capables d'ingérer des éléments de la gonade avec leur bouche et leur pharynx (Linke, 1934 ; Rees, 1936 ; Cheng, 1963). Elle peut consister en un écrasement des éléments germinaux lorsque les rédies ou les sporocystes atteignent un certain degré de développement (Rees, 1936). Ce peut être encore l'obstruction des vaisseaux sanguins par des rédies ou les sporocystes qui les compriment (Rees, 1936). Le parasite peut même constituer en un point de la masse viscérale un véritable barrage ou "blocking layer". La gonade, privée de la circulation sanguine, s'autolyserait alors sous l'effet d'un arrêt de l'apport nutritionnel et de l'accumulation des déchets du métabolisme et de débris cellulaires (Rees, 1936, pour *Cercaria emasculans* et James, 1965, pour *Cercaria roscovita)*.

2) L'activité chimique peut consister en un rejet de substances dans le Mollusque. Ces substances peuvent être notamment des déchets du métabolisme parasitaire (Rees, 1936) ou des enzymes (Cheng, 1964 ; Cheng et Snyder, 1962 ; Cheng et Yee, 1968). Elles peuvent exercer un effet toxique sur la gonade (Neuhaus, 1940) ou bien une action spécifique sur la lignée germinale (Cheng, Sullivan et Harris, 1973). Elles pourraient encore jouer un rôle hormonal selon l'hypothèse de McClelland et Bourns (1969). L'activité chimique peut consister aussi en un prélèvement de substances dans l'hôte (Szidat, 1942 ; Negus, 1968).

b. Sur le tractus génital. Depuis longtemps les auteurs ont remarqué chez les Mollusques Gastéropodes un synchronisme étroit entre l'évolution de la gonade et celle du tractus génital. En 1934, Linke formule l'hypothèse selon laquelle la glande reproductrice réglerait l'évolution des autres éléments de l'appareil génital par des moyens hormonaux. Cette idée a été confortée par les travaux de Filhol (1938), Abelôos (1943), Laviolette (1954), Runham et al. (1973), démontrant clairement, chez les Pulmonés Stylommatophores, une influence humorale de la glande hermaphrodite sur la partie glandulaire du tractus génital. Il en résulte que pour les animaux parasités les auteurs ont généralement interprété les formes peu développées du tractus génital comme une atrophie consécutive à la castration.

3. Discussion

Selon l'explication couramment admise, la gonade est détruite ou bien elle cesse son activité, sous l'action des Trématodes et par voie de conséquence les conduits

génitaux régressent. Cependant ce schéma n'explique pas certains effets du parasitisme, tels que l'apparition de la lignée ovocytaire chez *Calyptraea sinensis* en phase mâle, l'apparition d'un pénis sur des femelles de *Hydrobia ulvae* et la masculinisation du tentacule droit des femelles de *Campeloma rufum* par exemple.

De plus, certains travaux ont montré que le tractus génital des Gastéropodes peut suivre une évolution indépendante de celle de la gonade : chez *Littorina littorea* mâle soumis au jeûne, en décembre, le pénis demeure inchangé alors que la gonade régresse totalement en deux mois (Le Breton, 1971). Chez les trois Prosobranches gonochoriques, *Thais (Nucella) lapillus* (Blaber, 1970), *Nassarius obsoletus* (Smith, 1971) et *Ocenebra erinacea* (Poli, Salvat et Streiff, 1971) les femelles portent parfois un tractus génital mâle externe alors que l'ovogénèse est normale. Chez les Pulmonés Basommatophores, la castration chirurgicale réalisée sur des Bulins et des Planorbes n'arrête pas le développement des voies génitales des individus juvéniles ni leur fonctionnement chez les adultes matures (Brisson, 1970 ; Vianey-Liaud, 1972).

Dans ces conditions, il est permis de penser que de nombreuses modifications de l'appareil génital engendrées par les Trématodes ont une autre cause que la simple destruction de la glande reproductrice.

LE CONTROLE ENDOCRINE DE LA SEXUALITE CHEZ LES GASTEROPODES

Une série de travaux utilisant les techniques de la chirurgie, de la culture organotypique et de la biochimie, a été réalisée sur un petit nombre d'espèces : chez des Prosobranches hermaphrodites protandres (*Calyptraea*, *Crepidula*, dont le tractus génital se métamorphose lors du changement de sexe et *Patella*, dépourvu de tractus génital), des Prosobranches gonochoriques (*Buccinum*, *Littorina*, *Ocenebra*, *Viviparus*) et des Pulmonés, hermaphrodites (*Mymnaeae*, *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Planorbis*, *Helix*, *Arionidae*, *Limacidae*). Bien qu'ils soient parfois fragmentaires les résultats semblent avoir une valeur assez générale. Ils permettent de proposer - au moins provisoirement - quelques schémas explicatifs des processus du contrôle de la sexualité chez les Gastéropodes. Leur interprétation nécessite de bien distinguer les facteurs responsables de la différenciation sexuelle de l'appareil génital des facteurs responsables de son fonctionnement. La différenciation sexuelle se caractérise par la sexualisation des protogonies indifférenciées et par la morphogénèse du tractus génital dans le sens mâle ou dans le sens femelle. Le fonctionnement correspond à l'ensemble des phénomènes qui assurent la production des gamètes dans la gonade (multiplication, accroissement, maturation) et leur évolution dans les voies génitales.

1. La gonade. Les résultats, sensiblement comparables chez les Prosobranches et chez les Pulmonés conduisent au schéma suivant (fig. 1):

a. Les facteurs de la différenciation sexuelle

1) Il a été montré, chez plusieurs espèces, que la gonade se sexualise dans le sens femelle par autodifférenciation ovocytaire : livrées à elles-mêmes les protogonies évoluent en ovogonies puis en ovocytes (ceux-ci apparaissent spontanément dans les gonades isolées *in vitro*). Cependant ce phénomène d'autodifférenciation ne conduit pas l'évolution ovarienne jusqu'à son terme puisqu'en l'absence de toute influence humorale les jeunes ovocytes n'entrent pas en prévitellogénèse (*Calyptraea*, Streiff, 1967 (b) ; *Crepidula*, Lubet et Streiff, 1969 ; *Helix*, Guyard, 1969 ; *Arion*, Wattez, 1976).

Le sexe mâle est imposé à la gonade (qui est fondamentalement femelle) par un facteur différenciateur spermatogénétique qui fait évoluer les protogonies indifférenciées en spermatogonies. Ce facteur androgène est de nature humorale. Il est émis par les ganglions cérébroïdes (*Calyptraea*, Streiff, 1967 (b) ; *Crepidula*, Streiff et Lubet, 1969 ; *Helix*, Guyard, 1971). Chez *Calyptraea* il n'est émis que pendant la phase mâle (fig. 2).

2) Chez d'autres espèces, chez lesquelles la différenciation des gonies est très précoce, les facteurs déterminant la sexualisation n'ont pas été mis en évidence. C'est le cas de la Patelle dont la gonade apparaît fondamentalement bisexuée dès le stade juvénile.

b. Les facteurs du fonctionnement de la gonade

Les gonies différenciées vont se multiplier. Puis elles vont poursuivre leur évolution par une phase d'accroissement et une phase de maturation suivie de la spermiogénèse dans la lignée mâle.

1) La multiplication des gonies est stimulée par un facteur mitogène de nature humorale. Chez les Prosobranches ce facteur est émis par les ganglions cérébroïdes. Il assure aussi bien la multiplication des ovogonies que celle des spermatogonies. Il n'est donc pas sexualisé (Choquet, 1969 ; Streiff et Lubet, 1969) mais les deux lignées germinales peuvent présenter des seuils de sensibilité différents. Chez la Patelle, où elles coexistent, les ovogonies réagissent plus tardivement que les spermatogonies (Choquet, 1969).

De même, chez le Pulmoné *Helix aspersa*, le cerveau émet un facteur qui assure la multiplication des spermatogonies (Guyard, 1971). Il est à préciser que chez cette espèce les ovogonies ne se divisent pas. Le facteur mitogène n'agit donc que sur la lignée mâle et il ne se distingue pas du facteur androgène.

2) L'évolution de la lignée femelle. Les cellules de la lignée femelle ne sont capables d'évoluer par elles-mêmes que jusqu'au début de l'auxocytose. Elles poursuivent leur évolution grâce à l'intervention d'un facteur prévitellogénétique, de nature humorale. Ce facteur stimule l'accroissement ovocytaire et déclenche la prévitellogénèse suivie de la vitellogénèse. Chez les Prosobranches il est émis par les ganglions cérébroïdes, par impulsions, aux différentes périodes d'activité génitale femelle (Streiff, 1967 b, fig. 2 ; Choquet, 1969, fig. 3.). Chez les Pulmonés *Lymnaea stagnalis* (Joosse et Geraerts, 1969) et *Agriolimax reticulatus* (Wijdenes et Runham, 1976), un facteur vitellogène semblable est émis par les corps dorsaux. Il se pourrait que l'activité des corps dorsaux soit elle-même stimulée par les lobes latéraux des ganglions cérébroïdes (Geraerts, 1976). Chez *Helix*, seule une stimulation de la croissance ovocytaire a été mise en évidence *in vitro* au niveau du cerveau (qui comprend les ganglions cérébroïdes et les corps dorsaux : Guyard, 1967).

Chez les *Arionidae*, Pelluet et Lane (1961), Badino (1967) et Wattez (1976) ont également mis en évidence une activité cérébrale qui favorise l'apparition des ovocytes. Cependant leurs travaux ne permettent pas de préciser la nature des facteurs qui interviennent.

Enfin, il est possible que la maturation ovocytaire nécessite l'intervention de facteurs qui n'ont pas encore été précisés.

3) L'évolution de la lignée mâle. Bien qu'ils n'aient pas été mis en évidence de façon précise, il semble qu'un ou plusieurs facteurs soient nécessaires au déroulement de la spermatogénèse puisque celle-ci ne se maintient généralement pas dans les testicules et les ovotestis isolés *in vitro* (*Calyptraea*, Streiff, 1967 b ; *Crepidula*, Lubet et Streiff, 1969 ; *Viviparus*, Griffond, 1975 ; *Helix*, Guyard, 1971). Ces facteurs présumés pourraient être également d'origine cérébrale puisque chez *Lymnaea stagnalis* l'ablation des lobes latéraux des ganglions cérébroïdes ralentit la maturation et la spermiogénèse de la lignée mâle (Geraerts, 1976).

4) Enfin, il est à noter que le tentacule oculaire peut exercer une influence inhibitrice sur la gamétogénèse. Cette influence est variable selon les espèces. Chez la Patelle (fig. 3) les tentacules émettent, durant la phase mâle, un facteur inhibiteur constant de la spermatogénèse qui s'oppose à l'action mitogène cérébrale. La spermatogénèse se réalise lorsque l'activité mitogène cérébrale, cyclique, domine l'activité inhibitrice tentaculaire et déclenche la multiplication spermatogoniale. Les ovogonies sont alors insensibles au facteur cérébral. Elles ne se diviseront que plus tard, pour réaliser la phase femelle (Choquet, 1969).

Chez les Pulmonés Stylommatophores les tentacules manifestent également une activité inhibitrice qui s'exerce généralement sur la lignée femelle (Pelluet et Lane, 1961 ; Badino, 1967 ; Wattez, 1976, sur des *Arionidae* ; Guyard, 1971, sur *Helix*). Cependant chez

Ariolimax californicus l'inhibition tentaculaire s'exerce sur la spermatogénèse (Gottfried et Dorfman, 1970). Là encore les travaux réalisés chez les *Arionidae* ne permettent pas de préciser la nature du facteur tentaculaire.

c. Le déterminisme du sexe de la gonade

En définitive, le sexe de la gonade se réalise selon des processus différents suivant la nature des facteurs qui exercent le rôle essentiel. Chez les *Calyptraeidae* et les *Helicidae* le changement de sexe est dû à un changement de la sexualisation des protogonies, déterminé par le jeu de deux facteurs antagonistes : l'autodifférenciation ovocytaire et l'hormone androgène cérébrale. Chez les *Patellidae* dont la gonade est bisexuée dès le stade juvénile, le changement de sexe est fonctionnel : il est déterminé par une sensibilisation des ovogonies plus tardive que celle des spermatogonies au facteur mitogène, ce qui fait que la lignée femelle envahit la gonade après la lignée mâle. Enfin, chez les *Arionidae*, il semble que le sexe femelle soit déterminé par l'équilibre de deux facteurs antagonistes, l'un émis par le système nerveux et l'autre par les tentacules oculaires, qui permettent ou non à l'autodifférenciation ovocytaire de se manifester.

2) Le tractus génital

a. Chez les Prosobranches : les travaux, réalisés surtout par la méthode des cultures organotypiques, concernent essentiellement la différenciation sexuelle du tractus génital. Ils ont mis en évidence une influence du système nerveux central qui peut être présentée selon le schéma suivant (fig.4).

1) Les tractus génitaux, isolés *in vitro*, sont incapables d'évoluer par eux-mêmes. Ce sont des organes "neutres" qui nécessitent l'intervention de facteurs actifs pour se modifier (*Calyptraea*, Streiff, 1966 ; *Crepidula*, Lubet et Streiff, 1969 ; *Littorina*, Le Breton, 1969 ; *Ocenebra*, Féral, 1978).

2) Le tractus génital mâle se différencie sous l'action d'un facteur morphogénétique mâle émis par les ganglions pédieux (Le Gall et Streiff, 1974 ; Féral, 1978). Ce facteur transite par le tentacule oculaire droit qui est actif (Streiff, 1966 ; Lubet et Streiff, 1969 ; Féral, 1978). Chez les gonochoriques il n'existe que chez les mâles (Féral, 1978). Chez les hermaphrodites protandres son intensité varie avec l'âge de l'animal (fig. 5) et elle est maximum durant la phase mâle (Streiff, 1966).

L'activité morphogénétique pédieuse est elle-même contrôlée par les ganglions cérébro-pleuraux qui la stimulent chez le sexe mâle et qui l'inhibent chez le sexe femelle (Le Gall et Streiff, 1978, fig. 5).

3) Lors du changement de sexe, chez les hermaphrodites protandres, le tractus génital mâle régresse sous l'action d'un facteur de dédifférenciation émis par les ganglions pleuraux (Streiff, 1966 ; Lubet et Streiff, 1969). Son intensité varie avec l'âge de l'animal pour devenir maximum durant la phase femelle (fig. 5). Ce facteur dédifférenciateur pleural a été retrouvé chez les espèces gonochoriques étudiées (Le Breton, 1969 ; Le Gall, Griffond et Streiff, 1974). Il est présent chez les mâles et chez les femelles (Féral, 1976).

4) Le tractus génital femelle se différencie sous l'action d'un facteur morphogénétique femelle émis par les ganglions cérébro-pleuraux. Chez les espèces protandres il n'est émis que pendant un temps très court, au moment du changement de sexe (*Calyptraea*, Streiff, 1967 (a) ; *Crepidula*, Ny et Le Gall, 1976).

Ces facteurs, morphogénétiques et dédifférenciateur, sont de nature humorale. Ils sont interspécifiques et ils agissent, *in vitro*, entre espèces hermaphrodites (Streiff, Le Breton et Silberzahn, 1970), entre espèces gonochoriques (Le Gall, Griffond et Streiff, 1974) et entre espèces hermaphrodite et gonochorique (Streiff et Le Breton, 1970).

D'autre part, la différenciation sexuelle du tractus génital des Prosobranches apparaît indépendante de la gonade puisque chez les *Ocenebra* femelles présentant un organe génital mâle externe l'ovogénèse est normale. Le pénis n'est pas le vestige d'un état sexuel antérieur. Il suit un cycle évolutif annuel et il a été montré *in vitro* que sa présence est liée à une activité exceptionnelle du facteur morphogénétique pédieux (Féral, 1974).

En conclusion, chez les Prosobranches, le sexe mâle apparaît lorsque l'activité morphogénétique pédieuse se manifeste et domine le facteur dédifférenciateur pleural. Il disparaît (ou n'apparaît pas) dans le cas contraire.

En définitive, la différenciation sexuelle du tractus génital est déterminée par l'activité des ganglions cérébro-pleuraux qui émettent le facteur morphogénétique femelle et qui contrôlent l'activité morphogénétique mâle des ganglions pédieux.

b. Chez les Pulmonés : la formation des tractus génitaux comprend une phase de différenciation sexuelle et une phase de croissance. Cette croissance se réalise après l'organogénèse. Elle correspond à une mise en activité des voies génitales déjà sexualisées.

Les facteurs qui déterminent la différenciation sexuelle ne sont pas encore connus. Seul Harry (1965) a opéré la castration d'individus indifférenciés de *Biomphalaria (Taphius)* dont les tractus génitaux sont restés "immatures". Cette information laisse entendre que les organes génitaux se sont différenciés sans devenir fonctionnels mais elle ne le précise malheureusement pas. Elle ne permet donc pas de conclure sur l'indépendance de la différenciation sexuelle vis-à-vis de la gonade. (D'autre part, il est à noter, chez les *Arionidae* et les *Limacidae*, que le complexe pénial échappe, comme le pénis des

Prosobranches, à l'influence de la gonade : Laviolette, 1954 ; Wijdenes et Runham, 1976).

Par contre la croissance et l'activité des annexes glandulaires, qui peuvent être considérées comme deux aspects du fonctionnement des tractus génitaux, ont été l'objet d'études déjà nombreuses (fig. 6) :

1) L'influence de la gonade

- Chez les Stylommatophores, une série de résultats reposant sur les techniques chirurgicales ont établi clairement qu'une influence humorale de l'ovotestis est nécessaire à la croissance des annexes glandulaires (Filhol, 1938; Gomot, 1976 (a), sur *Helix* ; Abeloos, 1943 ; Laviolette, 1954 ; Runham, Bailey et Laryea, 1973, sur des *Arionidae* et des *Limacidae)*.

Chez *Helix aspersa*, l'ovotestis stimule également *in vitro* l'activité des glandes multifides (Gomot, 1974) et celle de la glande de l'albumine (Courtot, 1977).

Néanmoins l'activité des annexes glandulaires peut présenter une certaine autonomie puisqu'elle se maintient *in vitro* lorsqu'elle a commencé chez l'animal. C'est le cas, chez *Helix*, des glandes multifides (Hollande, 1968) et de la glande de l'albumine (Courtot, 1977).

- Chez les Basommatophores, il semble que la croissance des tractus génitaux nécessite une impulsion très précoce de la gonade pour commencer (cf. Harry, 1965). La croissance est ensuite, très tôt, indépendante de l'ovotestis comme le montre la castration réalisée chez les Bulins et les Planorbes (*Bulinus*, Brisson, 1970 ; *Biomphalaria (Australorbis)*, Vianey-Liaud, 1972) : le développement se poursuit normalement chez les individus opérés en phase prépubérale (juvéniles) comme chez les individus opérés en phase postpubérale (adultes).

L'acquisition de l'activité glandulaire nécessite elle-aussi une impulsion hormonale de la gonade puisque le tractus génital des castrats juvéniles se développe mais ne sécrète pas (Vianey-Liaud, 1972).

Ensuite, lorsqu'elle a commencé, l'activité glandulaire devient indépendante de l'ovotestis : elle se maintient chez les adultes matures qui continuent de produire des sécrètions et déposent des pontes stériles après castration (Brisson, 1970 ; Vianey-Liaud, 1972).

2) L'influence du système nerveux

Une autre série de travaux a mis en évidence, chez les Stylommatophores comme chez les Basommatophores, une influence humorale exercée par le système nerveux sur le développement et l'activité glandulaire des tractus génitaux.

Les corps dorsaux stimulent par voie humorale la croissance et la différenciation cellulaire des organes accessoires femelles (*Lymnaea*, Geraerts et Joosse, 1975 ; Geraerts et Algera, 1976 ; *Agriolimax*, Wijdenes et Runham, 1976). L'ablation des corps dorsaux est sans effet sur les organes mâles : prostate et complexe pénial (*Agriolimax*, Wijdenes et Runham, 1976). L'activité des corps dorsaux est donc sexualisée et il se pourrait qu'elle soit elle-même stimulée par les lobes latéraux des ganglions cérébroïdes (*Lymnaea*, Geraerts, 1976).

Les corps dorsaux stimulent aussi l'activité sécrétrice des organes femelles (*Lymnaea*, Veldhuijzen et Cuperus, 1976). Chez *Helix*, le cerveau (comprenant les ganglions cérébroïdes et les corps dorsaux) stimule également *in vitro* l'activité des glandes multifides (Gomot, 1976 b) et de la glande de l'albumine (Goudsmit, 1975 ; Courtot, 1977).

Enfin les cellules caudodorsales des ganglions cérébroïdes induisent l'ovulation par voie humorale, chez *Lymnaea* (Geraerts et Bohlken, 1976).

3) L'influence des tentacules oculaires

Chez les Stylommatophores, l'activité inhibitrice tentaculaire déjà observée sur la gonade s'exerce également sur la croissance de la glande de l'albumine (*Ariolimax*, Meenakshi et Scheer, 1969). Chez *Helix*, cette inhibition tentaculaire s'exerce *in vitro* sur l'activité de la glande de l'albumine (Courtot, 1977).

4) Les interactions des organes endocrines

Le fonctionnement des tractus génitaux des Pulmonés subit donc l'influence de la gonade, du système nerveux et, chez les Stylommatophores, des tentacules oculaires. Les relations qui existent entre ces organes sont encore mal définies. Selon Gottfried et al. (1967) la gonade pourrait modifier l'activité du système nerveux et des tentacules en libérant des stéroïdes en C_{19}. Dans le même sens, Runham et al. (1973) supposent que l'ovotestis stimule la production cérébrale de deux facteurs, mâle et femelle. Inversement, Joosse (1976) propose un modèle où le système nerveux contrôlerait la production hormonale de l'ovotestis : celui-ci produirait une hormone mâle sous l'influence des ganglions cérébroïdes et une hormone femelle sous l'influence des corps dorsaux. Ces hormones stimuleraient le développement du sexe correspondant sur le tractus génital.

5) En conclusion , chez les Pulmonés, le fonctionnement des tractus génitaux est sous l'influence de l'ovotestis, du système nerveux et, chez les Stylommatophores, des tentacules oculaires. Il semble que la croissance et l'activité des organes génitaux nécessitent chacune une impulsion humorale de la gonade pour commencer : l'une très précoce,

l'autre à la puberté. Chez les Stylommatophores, où elles subissent l'inhibition tentaculaire la croissance et l'activité des organes femelles nécessitent une influence humorale activatrice constante de l'ovotestis pour se réaliser et se maintenir alors que chez les Basommatophores, une fois déclenchées, la croissance et l'activité se maintiennent en l'absence de la gonade. Le système nerveux stimule également la croissance et l'activité des organes femelles.

Les interdépendances des différents éléments du contrôle endocrine - gonade, système nerveux et tentacules oculaires - restent à préciser.

3. Discussion

Si dans certains cas, la gonade peut jouer un rôle humoral pour assurer au tractus génital un développement conforme au sien, il apparaît que c'est le système nerveux central qui exerce un rôle directeur prédominant sur l'ensemble de l'appareil génital. Les ganglions cérébroïdes contrôlent la différenciation et le fonctionnement de la gonade en imposant le sexe mâle par un facteur androgène et en libérant les facteurs du fonctionnement des gamétogénèses : facteur mitogène, facteur prévitellogénétique... (chez les Pulmonés les ganglions cérébroïdes contrôlent probablement l'activité vitellogène des corps dorsaux). La différenciation sexuelle du tractus génital (chez les Prosobranches) est sous le contrôle des ganglions cérébro-pleuraux. Le sexe mâle est déterminé par le jeu de deux substances antagonistes : un facteur morphogénétique mâle d'origine pédieuse, lui-même contrôlé par les ganglions cérébro-pleuraux, et un facteur dédifférenciateur d'origine pleurale. Le sexe femelle se différencie sous l'action d'un facteur morphogénétique femelle cérébro-pleural. Enfin le fonctionnement des tractus génitaux (chez les Pulmonés) paraît être, lui aussi, sous l'influence du cerveau qui stimule la croissance et l'activité des organes femelles. Il s'oppose ainsi, chez les Stylommatophores, à l'activité inhibitrice tentaculaire.

En définitive, le système nerveux est sexualisé. Il détermine et coordonne la différenciation et le fonctionnement de la gonade et des tractus génitaux qui peuvent, en certaines circonstances, évoluer indépendamment les uns des autres.

Il convient de souligner que les organes du contrôle endocrine ne présentent généralement pas une activité constante : ils suivent des cycles d'activité au cours de la vie de l'animal. La réceptivité des organes soumis à leur influence peut elle-même varier comme le montre l'évolution de la sensibilité des ovogonies au facteur mitogène chez la Patelle. La combinaison de ces cycles d'activité, le jeu de leurs interactions et la réceptivité des organes soumis à leur influence, déterminent les cycles sexuels propres à chaque espèce.

L'environnement peut également déterminer des cycles propres à chaque station. Ainsi, chez *Ocenebra*, la présence du pénis sur les femelles varie en différents points des côtes de la Manche (à Granville aucune femelle ne présente cet organe), de l'Atlantique et de la Méditerranée (toutes les femelles en sont pourvues, en mars, à Tamaris), (Féral, 1974). Cette variation semble liée à l'environnement puisque chez *Crepidula* la présence du pénis varie chez les individus d'une même population, en fonction de la station d'élevage : il régresse au moment de l'inversion sexuelle sur les Crépidules des côtes de la Manche alors qu'il se maintient durant toute la phase femelle sur les animaux qui ont été transportés et élevés en Méditerranée (Le Gall, 1977). Dans les deux cas la présence du pénis chez les femelles est liée à une activité exceptionnelle du facteur morphogénétique pédieux (Féral, 1974 ; Le Gall, 1977).

Il convient aussi de rappeler que le milieu intérieur des Mollusques varie en fonction de l'environnement. La sexualité doit donc s'adapter aux fluctuations d'un milieu instable. Le système nerveux déclenche et coordonne les phénomènes nécessaires. Mais il exerce une certaine régulation et il réagit différemment aux facteurs externes selon le moment de son cycle évolutif, ce qui explique la variabilité des résultats expérimentaux. Ainsi, chez *Littorina littorea* mâle, le jeûne, qui est sans effet sur le pénis lorsqu'il est appliqué en décembre, déclenche la chute de cet organe en 15 jours lorsqu'il est appliqué en avril (Le Breton, inédit).

Il existe donc dans chaque Mollusque un équilibre endocrinien qui évolue et sur lequel s'exerce plus ou moins fortement l'influence des facteurs externes. Le Mollusque réagira différemment à une même intervention selon son état et son environnement.

L'ACTION POSSIBLE DES TREMATODES SUR LA SEXUALITE DES GASTEROPODES

La mise en évidence du contrôle endocrine de la sexualité permet d'envisager de nouvelles possibilités d'action des Trématodes sur l'appareil génital des Gastéropodes : ceux-ci peuvent agir directement sur la gonade et sur le tractus génital, mais ils peuvent agir aussi indirectement en modifiant le contrôle endocrine (fig. 7).

Giard (1911-1913) et Cheng et al. (1973) lient la notion d'action directe à un contact entre le parasite et l'organe cible. Pour nous, l'action sur un organe est directe lorsque l'activité parasitaire s'exerce sur celui-ci, sans intermédiaire. Si cette activité est de nature chimique le parasite peut agir à distance le contact n'étant pas nécessaire avec l'organe considéré. L'action sur un organe est indirecte lorsque le parasite agit sur celui-ci par l'intermédiaire d'un autre organe, ou tissu, sur lequel il exerce une activité. Il peut y avoir une succession de facteurs intermédiaires. Là encore l'activité

parasitaire peut s'exercer à distance et le parasite peut être ou non en contact avec l'organe étudié.

Selon cette acception, la présence ou l'absence du parasite dans un organe ne permet pas de préjuger de la nature directe ou indirecte de son action sur celui-ci.

1. Sur la gonade

Les larves de Trématodes peuvent agir directement sur la gonade en y exerçant une activité mécanique ou chimique.

Il se peut également qu'elles agissent indirectement en déréglant les fonctions endocrines comme le montre l'analyse de certains troubles de la différenciation et du fonctionnement de la glande reproductrice.

Chez *Calyptraea sinensis* parasité en phase mâle (Féral, Le Breton et Streiff, 1972), la dégénérescence de la spermatogénèse pourrait résulter de la suppression du facteur androgène cérébral sous l'action des rédies. L'autodifférenciation ovarienne se manifesterait alors par l'apparition des ovocytes. Enfin la castration ovocytaire qui suit la castration testiculaire correspondrait à l'inhibition du facteur mitogène cérébral. Au total, la féminisation puis la castration complète résulteraient d'un blocage de l'activité humorale des ganglions cérébroïdes.

Inversement, chez le Pulmoné *Succinea putris* infesté par *Leucochloridium paradoxum* (Wesenberg-Lund, 1931), l'arrêt de toute activité génitale femelle pourrait résulter d'une inhibition des corps dorsaux qui émettent les facteurs du fonctionnement femelle alors que la spermatogénèse se maintient pendant que les activités androgène et mitogène cérébrales demeurent. Par la suite, l'arrêt de ces dernières activités se traduirait par la castration complète. En d'autres termes, là encore les castrations successives, ovarienne et testiculaire, résulteraient d'un arrêt partiel puis total des fonctions endocrines cérébrales.

Chez *Biomphalaria glabrata* infesté par *Clinostomum*, Nassi (1975) observe la stérilisation de l'ovotestis alors que celui-ci n'est pas complètement détruit : les ovocytes n'arrivent pas à maturité et dégénèrent tandis que la maturation des éléments de la lignée mâle semble bloquée à un stade précoce. De même, chez *Lymnaea stagnalis* parasité par *Trichobilharzia ocellata*, McClelland et Bourns (1969) constatent une atrophie de la gonade avant que les sporocystes ne l'aient envahie. Dans ces deux derniers cas il se peut que le parasite agisse indirectement sur l'ovotestis (bien qu'étant dedans chez *Biomphalaria)*, en inhibant l'activité cérébrale nécessaire au fonctionnement des gamétogénèses.

En outre le blocage de l'activité génitale au niveau de son contrôle endocrine expliquerait la spécificité de l'action parasitaire observée parfois. Ainsi chez *Nassarius obsoletus* infesté par *Zoogonus rubellus* (Cheng, Sullivan et Harris, 1973) l'activité des sporocystes ne s'exerce que sur l'épithélium germinal : elle n'affecte ni les cellules de Leydig, ni l'épithélium des gonoductes, ni la glande digestive.

2. Sur le tractus génital

Les larves de Trématodes peuvent agir directement sur le tractus génital comme le montre la chute du pénis de *Littorina littorea* déclenchée *in vitro* par les sporocystes de *Renicola roscovita* Le Breton, 1977).

Il se peut également qu'elles agissent indirectement sur la différenciation et le fonctionnement des tractus génitaux en agissant sur la gonade ou sur le système nerveux.

a. Les anomalies de la différenciation

1) Si l'on se réfère aux résultats de l'endocrinologie expérimentale obtenus chez les Prosobranches, la castration parasitaire ne doit pas influencer la différenciation des tractus génitaux puisque celle-ci paraît indépendante de la gonade. De même, chez le Pulmoné *Succinea putris* infesté par *Leucochloridium paradoxum*, le pénis réduit à un "fil" observé par Wesenberg-Lund (1931), doit avoir une autre cause que la destruction de l'ovotestis, puisque l'ablation chirurgicale de celui-ci est sans effet sur le complexe pénial.

2) Par contre, il a été montré chez les Prosobranches que les organes génitaux ne peuvent évoluer par eux-mêmes. Leur différenciation se réalise sous l'action de facteurs morphogénétiques émis par les ganglions cérébro-pleuraux pour le sexe femelle et par les ganglions pédieux (contrôlés par les ganglions cérébro-pleuraux) pour le sexe mâle. Leur régression nécessite un facteur humoral émis par les ganglions pleuraux.

Les cas de véritable dédifférenciation du tractus génital apparaissent donc comme une manifestation anormale du facteur dédifférenciateur pleural.

Par contre, certains organes génitaux réduits sont en fait des organes dont la morphogénèse ne s'est pas réalisée normalement. Ce serait le cas du pénis, parfois, chez *Bithynia* (Neuhaus, 1940) et *Hydrobia (Peringia*, Rothschild, 1938). Ce blocage de la différenciation résulterait d'une inhibition du facteur morphogénétique pédieux.

Inversement, l'apparition d'un pénis sur certaines femelles parasitées de *Hydrobia ulvae* (Krull, 1935 ; Rothschild, 1938) correspond à une stimulation du facteur morphogénétique pédieux.

Les larves de Trématodes pourraient donc engendrer des anomalies de la différenciation du tractus génital en inhibant ou en stimulant l'activité endocrine des ganglions nerveux.

b. Les anomalies du fonctionnement

1) Si l'on se réfère aux résultats de l'endocrinologie expérimentale, la castration parasitaire peut être responsable, au moins chez les Pulmonés Stylommatophores, de la réduction des voies génitales correspondant à un arrêt de leur fonctionnement. Cette influence de la castration est cependant limitée, particulièrement chez les Basommatophores. Chez *Biomphalaria (Taphius, Australorbis)*, stérilisé par *Ribeiroia ondatrae* (Harry, 1965) ou par *Clinostomum* (Nassi, 1975), le tractus génital de certains individus reste développé. Il peut même déposer des pontes stériles (Nassi, 1975) se comportant ainsi comme les adultes castrés chirurgicalement (cf. Vianey-Liaud, 1972).

2) L'arrêt du fonctionnement des voies génitales, qui se traduit généralement par une réduction de la taille des organes, pourrait résulter d'une inhibition de l'activité stimulante du contrôle endocrine cérébral.

Ainsi chez *Menetus dilatatus* infesté par *Spirorchis scripta* (Hosier et Goodchild, 1970) l'oviposition est bloquée avant que les sporocystes n'atteignent la gonade : ce blocage pourrait résulter d'une inhibition de l'activité des cellules caudo-dorsales des ganglions cérébroïdes qui induisent normalement l'ovulation (cf. Geraerts et Bohlken, 1976).

3. Discussion

Il convient de souligner l'influence que peut exercer le jeûne sur la sexualité et par suite, le rôle qu'il peut jouer dans l'action parasitaire. Chez *Lymnaea stagnalis* (Joosse, Boer et Cornelisse, 1968), le jeûne entraîne chez les animaux sains un ralentissement puis un arrêt de l'oviposition au-delà d'une semaine alors que l'ovotestis continue de fonctionner. De même chez *Biomphalaria glabrata (Australorbis glabratus)* le jeûne entraîne le blocage de l'oviposition en 24 heures (Vianey-Liaud, 1973). Il est donc possible qu'il soit responsable du même phénomène chez le Pulmoné *Menetus dilatatus* infesté par *Spirorchis scripta* (exemple étudié précédemment). Dans ce cas, la nutrition des sporocystes créerait chez l'hôte un état de déficience alimentaire qui inhiberait la stimulation cérébrale de l'oviposition.

L'action parasitaire sur le système nerveux n'impliquerait donc pas nécessairement l'émission de substances spécifiques. L'appauvrissement de l'hémolymphe, lorsque le parasite se nourrit, déclencherait de la part de l'hôte des réactions d'économie métabolique se traduisant par le blocage de l'oviposition puis l'arrêt du fonctionnement de l'appareil génital.

En conclusion, il apparaît que l'action des Trématodes sur la sexualité des Gastéropodes peut être variée, non seulement par l'activité possible des stades larvaires, mais aussi par les organes ou les tissus qu'elle peut affecter. Les larves peuvent exercer une influence sur l'appareil génital quelle que soit leur localisation dans l'hôte. Elles peuvent agir directement sur la gonade et sur les tractus génitaux, ou bien indirectement en exerçant une activité sur d'autres tissus ou organes tels que le système nerveux. Dans ce cas, elles pourraient stimuler ou inhiber une fonction humorale. Seule l'étude expérimentale permettra de préciser l'action parasitaire pour laquelle on ne peut encore que proposer des hypothèses.

L'APPROCHE EXPERIMENTALE DE L'ACTION DES TREMATODES SUR LA SEXUALITE DES GASTEROPODES

L'étude expérimentale de l'action des Trématodes sur la sexualité des Gastéropodes est délicate du fait du grand nombre de facteurs qui interviennent. Ces facteurs sont propres au parasite, au Mollusque et à l'environnement. Ils engendrent une variabilité de l'activité parasitaire et des réactions de l'hôte. Ils doivent être recherchés puis contrôlés, pour obtenir des résultats expérimentaux interprétables et reproductibles.

Nous avons entrepris cette étude chez le Prosobranche gonochorique *Littorina littorea* L.

1. L'analyse descriptive du parasitisme

L'étude expérimentale de l'action des Trématodes impose de bien connaître les parasites, leur évolution et leurs effets.

a. La détermination des Trématodes nécessite la réalisation expérimentale de leur cycle évolutif pour obtenir les adultes. Ainsi avons nous déterminé les trois espèces retenues pour notre étude, à savoir : *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831), *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) et *Renicola roscovita* (Stunkard, 1932).

Cependant la reconnaissance de l'espèce est une difficulté à résoudre chaque fois que l'étude porte sur un Mollusque infesté naturellement. La détermination chétotaxique des cercaires peut alors se révéler une technique de choix (Richard, 1971) pour distinguer des formes larvaires présentant de grandes similitudes morphologiques.

b. L'observation de Mollusques parasités

L'essentiel des études réalisées par les auteurs repose sur l'analyse de Mollusques infestés naturellement dont la coquille a été cassée et dont il a été fait un bilan parasitaire. Mais à chaque fois ce bilan ne correspond qu'à la résultante, à un moment donné, des cycles évolutifs du parasite et du Mollusque. Ces observations, qui se heurtent à la difficulté de déterminer le parasite à ses stades larvaires, se heurtent aussi à la variabilité des effets observés (chez *Littorina littorea* presque tous les états possibles du tractus génital ont été constatés). De plus elles soulèvent des questions auxquelles elles ne peuvent répondre car elles sont ponctuelles, statiques. Elles ne permettent d'appréhender l'action parasitaire qu'à partir de relations simples supposées, à priori, entre le parasite et ses effets.

Il est nécessaire pour comprendre et analyser l'action d'un Trématode d'en connaître le déroulement, ce qui pose la double question de l'évolution du parasite et de ses effets.

c. L'évolution du parasite dans le Mollusque est encore mal connue selon les espèces : combien de temps mettent les formes larvaires à se développer, présentent-elles des phases involutives, à quels moments exercent elles une activité sur l'hôte et quelle est la durée du parasitisme ? Autant de questions pour lesquelles une réponse ne peut être approchée qu'en infestant des Mollusques sains et en suivant leur évolution.

d. L'évolution de l'appareil génital du Mollusque infesté est une question essentielle.

Les organes génitaux, plus ou moins réduits, sont-ils des organes qui se dédifférencient et qui vont disparaître, ou bien sont-ils des organes qui cessent leur activité et qui entrent en repos ? Sont-ils encore des organes bloqués dans leur évolution ou bien même, dans certains cas, des organes en cours de morphogénèse ou en reprise d'activité ?

De même les organes génitaux développés sont-ils dus à un développement très rapide du parasite qui ne leur a pas laissé le temps de régresser, ou bien continuent-ils d'évoluer plus ou moins normalement en la présence d'un parasitisme bien établi ?

Là encore la réponse ne peut être obtenue qu'en suivant l'évolution d'animaux parasités.

C'est ainsi que j'ai pu constater, chez *Littorina littorea*, que le pénis ne régresse pas sous l'action des Trématodes, de même qu'il ne régresse pas au cours de son cycle évolutif normal (chez les littorines saines il tombe une fois par an après la période de reproduction, à la fin du printemps, puis il repousse durant l'été et l'automne). Chez les mâles infestés par *Himasthla* et *Cryptocotyle* le pénis qui est "réduit", est en fait un organe bloqué dans sa morphogénèse. Par contre, chez les mâles infestés par *Renicola*, le pénis suit un cycle évolutif particulièrement net et différent du cycle normal puisqu'il peut tomber deux ou trois fois par an. L'ébauche qui réapparaît à chaque fois présente une morphogénèse active et le pénis peut être observé à tous les stades de son développement sur les animaux parasités.

Ces résultats inédits démontrent clairement une action spécifique différente selon les espèces étudiées. Dans le premier cas (*Himasthla* et *Cryptocotyle*), l'action se traduit par un blocage de la différenciation du pénis. Dans le second (*Renicola*), elle se manifeste par la chute de cet organe.

2. L'étude expérimentale de l'action des Trématodes

Les espèces parasitaires étant bien connues, ainsi que leur évolution et leurs effets sur le Mollusque, il reste à déterminer par quelles voies les larves de Trématodes agissent sur la sexualité de l'hôte, ce qui soulève trois catégories de questions concernant:

1) Le Mollusque, sa physiologie et sa sexualité. Comment se déroule cette dernière au cours de la vie de l'animal et quels sont les facteurs internes et externes qui la dirigent et l'influencent ?

2) Les réactions de l'hôte sur le parasite, qui peuvent dépendre de facteurs divers, tels que le sexe de l'hôte par exemple. Ainsi l'infestation expérimentale de *Littorina littorea* par *Cryptocotyle lingua* se traduit 16 mois plus tard par un parasitisme bien visible des mâles, qui sont envahis par des rédies filles dépassant 1 mm de long et produisant des cercaires, tandis que chez les femelles le parasitisme est invisible macroscopiquement : il ne comprend que des rédies mères transparentes et inférieures à 400 um de long qui se multiplient activement. Chez la Littorine le sexe femelle inhibe donc l'apparition des rédies filles matures productrices de cercaires (inédit).

3) <u>L'activité du parasite</u>. Quelle est sa nature, sont évolution ? Sur quels organes de l'hôte s'exerce-t-elle et quelles réactions déclenche-t-elle dans celui-ci ?

Le parasite agit-il directement sur les organes génitaux ou bien indirectement en exerçant son activité sur les organes endocrines ? Et dans ce cas quelles fonctions modifie-t-il ?

L'action parasitaire sur le tractus génital peut-elle résulter de la destruction de la gonade, et dans ce cas jusqu'à quel degré d'existence celle-ci peut-elle exercer une influence ?

Chez *Biomphalaria (Taphius)*, Harry (1965) estime que 5 ou 6 follicules de l'ovotestis sont suffisants pour induire le développement des organes génitaux accessoires.

L'analyse expérimentale du parasitisme dont le processus est de dissocier chaque fois que c'est possible les interactions entre les organes et les organismes en présence, doit faire appel aux méthodes de la Biologie expérimentale. Elle trouve une technique particulièrement bien adaptée avec la méthode des cultures organotypiques qui permet d'isoler des modèles simples d'interaction entre les larves de Trématodes et les organes du Mollusque.

Enfin, l'étude expérimentale nécessite une investigation biochimique des rapports hôte-parasite visant à la détection, l'isolement et l'analyse des substances échangées ainsi qu'à l'étude de leur transit et de leurs sites d'action dans les organismes en présence.

CONCLUSION

La sexualité des Mollusques Gastéropodes est réglée par le système nerveux central qui détermine et coordonne, par voie endocrine, l'évolution de la gonade et des tractus génitaux.

D'autre part, le parasitisme des Trématodes digénétiques engendre de nombreuses anomalies de l'appareil génital que la simple destruction de la glande reproductrice ne peut expliquer. L'interprétation de l'action du parasite ne doit donc plus tenir compte uniquement du contrôle hormonal que la gonade peut exercer sur le tractus génital et qui disparaîtrait à la suite de la castration. Elle doit tenir compte aussi d'une activité chimique probable que les larves de Trématodes peuvent exercer sur les organes génitaux ou bien sur le contrôle endocrine.

L'action du parasite sur la sexualité de l'hôte est très variable et complexe à étudier du fait des facteurs nombreux qui participent à sa réalisation ou qui peuvent l'influencer. Il arrive que le Mollusque réagisse très différemment à une même intervention externe, donc au parasitisme, en fonction de son état, de son environnement et de la régulation exercée par le système nerveux qui suit un cycle évolutif fonctionnel.
L'activité parasitaire elle-même varie, selon les espèces, en fonction de l'évolution des larves et des réactions de l'hôte sur celles-ci.

L'étude expérimentale de l'action des Trématodes sur la sexualité des Gastéropodes doit donc en premier lieu rechercher et contrôler les facteurs responsables de la variabilité de l'activité parasitaire et des réactions de l'hôte. Elle se doit ensuite de mettre en évidence les relations biochimiques et les interactions qui existent entre les formes larvaires et les différents organes du Mollusque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABELOOS M., 1943 - Effets de la castration chez un Mollusque (*Limax maximus*). *C. R. Acad. Sc., Paris, 216*, 90-92.

ANKEL F., 1962 - *Hydrobia ulvae* Pennant und *Hydrobia ventrosa* Montagu als Wirte larvaler Trematoden. *Vidensk. Meddr. dansk naturh. Foren., 124*, 1-100.

BADINO G., 1967 - I fattori della gametogenesi di *Arion rufus* Drap. (Gasteropoda Pulmonata) studiati con il metodo della cultura *"in vitro"*. *Arch. Zool. Ital., 52*, 271-275.

BLABER S.J.M., 1970 - The occurence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L). *Proc. malac. Soc. London, 39*, 231-233.

BRISSON P., 1970 - Contribution à l'étude des corrélations entre les différentes régions de l'appareil génital, par castration, ablation, implantation, chez quelques Mollusques Gastéropodes Pulmonés Basommatophores et principalement chez *Bulinus truncatus* (Audouin). Thèse Doct. Sc. Nat. Poitiers, 154 p., 14 pl.

CHENG, T.C., 1963 - The effects of *Echinoparyphium* larvae on the structure of and glycogen deposition in the hepatopancreas of *Helisoma trivolvis* and glycogenesis in the parasite larvae. *Malacologia, 1*, 291-303.

CHENG T.C., 1964 - Studies on phosphatase systems in hepatopancreatic cells of the molluscan host of *Echinoparyphium* sp. and in the rediae and cercariae of this trematode. *Parasitology, 54*, 73-79.

CHENG T.C. and SNYDER R.W. Jr., 1962 - Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I.A. review. II. The utilisation of the host's glycogen by the intramelluscan larvae of *Glypthelmins pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. *Trans. Amer. micr. Soc., 81*, 209-228.

CHENG T.C., SULLIVAN J.T. and HARRIS K.R., 1973 - Parasitic castration of the marine prosobranch gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonus rubellus* (Trematoda) : *Histopathology*. *J. Invertebr. Pathol., U.S.A., 21*, (2), 183-190.

CHENG T.C. and YEE H.W.F., 1968 - Histochemical demonstration of aminopeptidase activity associated with the intramolluscan stages of *Philophthalmus gralli* Mathis et Léger. *Parasitology, 58*, 473-480.

CHOQUET M., 1969 - Contribution à l'étude du cycle biologique et de l'inversion du sexe chez *Patella vulgata* L. (Mollusque Gastéropode Prosobranche). Thèse Doct. Sc. Nat., Lille, 234 p., 19 pl.

COURTOT A., 1977 - Etude cytologique et expérimentale de la différenciation et de la sécrétion de la glande à albumine de l'escargot : *Helix aspersa* Müll. Thèse Doct. Sc. Biol., Besançon, 59 p., 23 pl.

FERAL C., 1974 - Etude statistique et endocrinologique de la présence d'un tractus génital mâle externe chez les femelles de 3 Gastéropodes Prosobranches gonochoriques. Thèse Doct. Sc. Biol., Caen, 178 p., 76 fig., 32 tabl.

FERAL C., 1978 - Présence des facteurs morphogénétique et dédifférenciateur du pénis chez un Mollusque Prosobranche gonochorique *Ocenebra erinacea* (L). *C.R. Acad. Sc. Paris, 287*, p. 1235-1237.

FERAL C., LE BRETON J. et STREIFF W., 1972 - Données nouvelles sur l'action de la castration parasitaire chez quelques Mollusques Gastéropodes. *Ann. Inst. Michel Pacha, 5*, p. 28-40.

FILHOL J., 1938 - Recherches sur la nature des lépidosomes et les phénomènes cytologiques de la secrétion chez les Gastéropodes pulmonés. *Arch. Anat. Micr. Fr., 34*, 155-218 et 375-439.

GARNAULT P., 1889 - La castration parasitaire chez *Helix aspersa*. *Bull. Sc. Fr. Belg., 20*, 137-141.

GERAERTS W.P.M., 1976 - The role of the lateral lobes in the control of growth and reproduction in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol., 29*, 97-108.

GERAERTS W.P.M. and ALGERA L.H., 1976 - The stimulating effect of the dorsalbody hormone on cell differentiation in the female acessory sex organs of the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol., 29*, 109-118.

GERAERTS W.P.M. and BOHLKEN S., 1976 - The control of ovulation in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by the neurohormone of the caudodorsal cells. *Gen. Comp. Endocrinol., 28*, 350-357.

GERAERTS W.P.M. and JOOSSE J., 1975 - Control of vitellogenesis and of growth of female accessory sex organs by the dorsal body hormone (DBH) in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol., 27*, 450-464.

GIARD A., 1911-1913 - "Oeuvres diverses", 2 vols. Lab. d'Evol. Etres Organ., Paris.

GOMOT L., 1974 - Etude en culture organotypique du rôle endocrine de la glande hermaphrodite dans l'activation des cellules des glandes multifides de l'Escargot *Helix aspersa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *22*, 366.

GOMOT L., 1976 (a) - Ultrastructural changes in the multifid glands of the Snail *Helix aspersa* following castration. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *29*, 159.

GOMOT L., 1976 (b) - Etude de l'activité génitale de Mollusques Gastéropodes (Paludines et Escargots) par la méthode des cultures d'organes. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, *101*, Supl. N°2, p. 24-34.

GOTTFRIED H. and DORFMAN R.I., 1970 - Steroid of Invertebrates. IV. On the optic tentacle-gonadal axis in the control of the male-phase ovotestis in the slug *(Ariolimax californicus)*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *15*, 101-119.

GOTTFRIED H., DORFMAN R.I., FORCHIELLI E. and WALL P.E., 1967 - Aspects of the reproductive endocrinology of the giant land slug *Ariolimax californicus* (Stylommatophora : Gastropoda). *Gen. Comp. Endocrinol.*, *9*, 454-470.

GOUDSMIT E.M., 1975 - Neurosecretory stimulation of galactogen synthesis within the *Helix pomatia* albumen gland during organ culture. *J. Exp. Zool.*, *191*, 193-198.

GRIFFOND B., 1975 - Analyse expérimentale en culture "*in vitro*" des facteurs de la gamétogénèse chez la Paludine *Viviparus viviparus* L. *Ann. Sc. Zool. Physiol. Biol. Anim.* Besançon, *12*, 73-97.

GUYARD A., 1967 - Féminisation de la glande hermaphrodite juvénile d'*Helix aspersa* Müll. associée *in vitro* au ganglion cérébroïde d'Escargot adulte ou de Paludine femelle. *C.R. Acad. Sc.*, *Paris*, *265*, 145-149.

GUYARD A., 1969 - Autodifférenciation femelle de l'ébauche gonadique de l'Escargot *Helix aspersa* Müll. cultivée sur milieu anhormonal. *C.R. Acad. Sc. Paris*, *268*, 966-969.

GUYARD A., 1971 - Etude de la différenciation de l'ovotestis et des facteurs contrôlant l'orientation sexuelle des gonocytes de l'Escargot *Helix aspersa* Müll. Thèse Doct. Sc. Nat. Besançon, 187, 43 pl.

HARRY H.W., 1965 - Evidence of a gonadal hormone controlling the development of the accessory reproductive organs in *Taphius glabratus* (Say) (Gastropoda, Basommatophora). *Trans. Amer. Micr. Soc.*, *84*, 157.

HOLLANDE E., 1968 - Evolution des grains de sécrétion dans les cellules des glandes multifides d'*Helix pomatia*, maintenues en survie expérimentale. *C.R. Acad. Sc. Paris*, *267*, 1054-1057.

HOSIER D.W. and GOODCHILD C.G., 1970 - Suppressed egg-laying by snails infected with *Spirorchis scripta* (Trematoda, Spirorchiidae). *J. Parasitol.*, *56*, 302-304.

JAMES B.L., 1965 - The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal prosobranch, *Littorina saxatilis* (Olivi) subsp. *tenebrosa* (Montagu). *Parasitology*, *55*, 93-115.

JOOSSE J., 1976 - Endocrinology of Molluscs. *Coll. Internat.*, *C.N.R.S.*, *251*, 107-123.

JOOSSE J., BOER M.H. and CORNELISSE J., 1968 - Gametogenesis and oviposition in *Lymnaea stagnalis* as influenced by γ- irradiation and hunger. *Symp. zool. Soc. London*, *22*, 213-235.

JOOSSE J. and GERAERT W.J., 1969 - On the influence of the dorsal bodies and the adjacent neurosecretory cells on the reproduction and metabolism of *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *13*, 540.

KRULL H., 1935 - Anatomische Untersuchungen an einheimischen Prosobranchiern und Beiträge zur Phylogenie der Gastropoden. *Zool. Jb.*, *Anat.*, *60*, 399-464.

LAVIOLETTE P., 1954 - Rôle de la gonade dans le déterminisme humoral de la maturité glandulaire du tractus génital chez quelques gastéropodes *Arionidae* et *Limacidae*. *Bull. Biol. Fr. Bel.*, *88*, 310-332.

LE BRETON J., 1969 - Analyse expérimentale comparée des facteurs déterminants du cycle du tractus génital mâle chez un Gastéropode hermaphrodite *Crepidula fornicata* Phil. et chez un Gastéropode gonochorique *Littorina littorea* L. Thèse Doct. Sc. Biol. Caen, 113 p., 9 pl. 21 tabl.

LE BRETON J., 1971 - Etude expérimentale de l'influence du jeûne sur le cycle de la gonade mâle et du pénis chez *Littorina littorea* L. *Haliotis*, *1*, (1), 25-26.

LE BRETON J., 1977 (1979) - Mise en évidence *in vitro*, d'une action chimique directe du Trématode *Renicola roscovita* (Stunkard, 1932) sur le tractus génital mâle de *Littorina littorea* L. (Mollusque Prosobranche gonochorique). *Haliotis*, *8*.

LE GALL S., 1977 - Analyse expérimentale d'un asynchronisme entre l'état du tractus génital externe et le cycle de la gonade chez *Crepidula fornicata* Phil. Mollusque hermaphrodite protandre. *C.R. Acad. Sc. Paris*, *284*, 2143-2146.

LE GALL S., GRIFFOND B. et STREIFF W., 1974 - Existence de facteurs endocriniens de la morphogénèse et de la régression du pénis chez *Buccinum undatum* et *Viviparus viviparus*, Mollusques, Gastéropodes, gonochoriques. *C.R. Acad. Sc. Paris, 278*, 773-776.

LE GALL S. et STREIFF W., 1974 - Présence du facteur morphogénétique du pénis au niveau des ganglions pédieux chez des Mollusques Prosobranches hermaphrodites (*Crepidula, Calyptraea*) et gonochoriques (*Littorina, Buccinum*). *C.R. Acad. Sc., Paris, 279*, 183-186.

LE GALL S. et STREIFF W., 1978 - Contrôle du facteur pédieux morphogénétique du pénis par les ganglions cérébro-pleuraux chez *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque hermaphrodite protandre). *C.R. Acad. Sc., Paris, 287*, 1305-1307.

LINKE O., 1934 - Über die Beziehungen zwischen Keimdrüse und Soma bei Prosobranchiern. *Verhandl. Deutsch. Zool. Gesellsch., 34*, 164-175.

LUBET P. et STREIFF W., 1969 - Etude expérimentale de l'action des ganglions nerveux sur la morphogénèse du pénis et l'activité génitale de *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque gastéropode). Cours et Documents de Biologie, Gordon and Breach, Ed. Paris, 141-159.

MATTOX N.T., 1938 - Morphology of *Campeloma rufum*, a parthenogenetic snail. *J. Morph., 62*, 243-261.

McCLELLAND G. and BOURNS T.K.R., 1969 - Effects of *Trichobilharzia ocellata* on growth, reproduction and survival of *Lymnaea stagnalis*. *Exp. Parasitol., 24*, 137-146.

MEENAKSHI V.R. and SCHEER B.T., 1969 - Regulation of galactogen synthesis in the slug *Ariolimax columbianus*. *Comp. Biochem. Physiol., 29*, 841-845.

NASSI H., 1975 - Recherches sur le cycle biologique d'un Trématode Clinostomidae de Guadeloupe. Stérilisation du premier hôte intermédiaire, *Biomphalaria glabrata*. *Proc. Sec. Europ. Multicolloqu . Parasitol., Trogir*, 119-129.

NEGUS M.R.S., 1968 - The nutrition of sporocysts of the trematode *Cercaria doricha* Rotchschild, 1935 in the molluscan host *Turritella communis* Risso. *Parasitology, 58*, 355-366.

NEUHAUS W., 1940 - Parasitäre Kastration bei *Bithynia tentaculata*. *Z. ParasitKde., 12*, 65-77.

NY K. et LE GALL S., 1976 - Présence du facteur morphogénétique du vagin au niveau des ganglions pleuraux chez des Mollusques prosobranches hermaphrodite (*Crepidula fornicata*) et gonochorique (*Thais lapillus*). *C.R. Acad. Sc. Paris, 283*, 1659-1662.

PELLUET D. and LANE N.J., 1961 - The relation between neurosecretion and cell differentiation in the ovotestis of slugs (Gasteropoda : Pulmonata). *Can. J. Zool., 39*, 789-805.

POLI G., SALVAT B. et STREIFF W., 1971 - Aspect particulier de la sexualité chez *Ocenebra erinacea* (Mollusque, Gastéropode, Prosobranche). Note préliminaire. *Haliotis, 1* (1), 29-30.

REES W.J., 1936 - The effect of parasitism by larval trématodes on the tissues of *Littorina littorea* (Linné). *Proc. zool. Soc. London, 2*, 357-368.

RICHARD J., 1971 - La chétotaxie des cercaires. Valeur systématique et phylétique. *Mémoires Mus. Nat. Hist. Nat., A, 67*, 1-179.

ROTHSCHILD M., 1938 - Further observations on the effect of trematode parasites on *Peringia ulvae* (Pennant) 1777. *Novit. zool., 41*, 84-102.

RUNHAM N.W., BAILEY T.G. and LARYEA A.A., 1973 - Studies of the endocrine control of the reproductive tract of the grey field slug *Agriolimax reticulatus*. *Malacologia, 14*, 135-142.

SMITH B., 1971 - Sexuality in the american mud snail *Nassarius obsoletus* Say. *Proc. malac. Soc. London, 39*, 337-378.

STREIFF W., 1966 - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un mollusque hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* (L). I - Mise en évidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus génital mâle. *Ann. Endocrinol., Paris, 27*, Suppl. N°3 bis, 385-400.

STREIFF W., 1967 (a) - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un mollusque hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* (L) II - Mise en évidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution du tractus femelle. *Ann. Endocrinol., Paris, 28*, 461-472.

STREIFF W., 1967 (b) - Etude endocrinologique du déterminisme du cycle sexuel chez un Mollusque hermaphrodite protandre *Calyptraea sinensis* (L). III - Mise en évidence par culture *in vitro* de facteurs hormonaux conditionnant l'évolution de la gonade. *Ann. Endocrinol., Paris, 28*, 641-656.

STREIFF W. et LE BRETON J., 1970 - Etude comparée en culture *in vitro* des facteurs responsables de la morphogénèse et de la régression du tractus génital mâle externe chez deux Mollusques Gastéropodes Prosobranches *Crepidula fornicata* Phil. (espèce protandre) et *Littorina littorea* (L) (espèce gonochorique). *C.R. Acad. Sc., Paris, 270*, 632-634.

STREIFF W., LE BRETON J. et SILBERZAHN N., 1970 - Non spécificité des facteurs hormonaux responsables de la morphogénèse et du cycle du tractus génital mâle chez les mollusques Prosobranches. *Ann. Endocrinol., Paris, 31* (3), 548-556.

STREIFF W. et LUBET P., 1969 - Influence des ganglions cérébroïdes dans le déterminisme du cycle sexuel d'un Mollusque hermaphrodite *Crepidula fornicata* Phil. *Gen. Comp. Endocrinol., 13*, (3), N° 139.

SZIDAT L., 1942 - Bemerkungen zur sogenannten parasitären Kastration von Mollusken. *Z. ParasitKde., 12*, 251-258.

VELDHUIJZEN J.P. and CUPERUS R., 1976 - Effects of starvation, low temperature and the dorsal body hormone on the *in vitro* synthesis of galactogen and glycogen in the albumen gland and the mantle of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Zool. Netherl., 26*, (1), 119-135.

VIANEY-LIAUD M., 1972 - Etude du contrôle de la maturité des tractus génitaux et de la ponte par castration chirurgicale chez le planorbe *Australorbis glabratus* Say (Pulmoné Basommatophore). *Bull. Soc. Zool. Fr., 97* (4), 675-690.

VIANEY-LIAUD M., 1973 - Influence du jeûne sur la production d'oeufs et la ponte chez le Planorbe *Australorbis glabratus* (Gastéropode Pulmoné). *Bull. Soc. Zool. Fr., 98*, 349-361.

WATTEZ C., 1976 - Rôle des tentacules oculaires dans la différenciation sexuelle d'*Arion subfuscus* Drap. (Mollusque Gastéropode Pulmoné). Etude *in vivo* et *in vitro* par la méthode des cultures organotypiques. *Bull. Soc. Zool. Fr., 101*, Suppl. N°4, 96-102.

WESENBERG-LUND C., 1931 - Contributions to the development of the Trematoda Digenea. I. The biology of *Leucochloridium paradoxum* K. dans K. *Vidensk. Selsk., 4*, 90-142.

WIJDENES J. and RUNHAM N.W., 1976 - Studies on the function of the dorsal bodies of *Agriolimax reticulatus* (Mollusca ; Pulmonata). *Gen. Comp. Endocrinol., 29*, 545-551.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 243 à 248

PROLIFERATIVE DISORDERS IN *CRASSOSTREA VIRGINICA* AND *MYA ARENARIA* FROM THE CHESAPEAKE BAY AND INTRANUCLEAR VIRUS-LIKE INCLUSIONS IN *MYA ARENARIA* WITH GERMINOMAS FROM A MAINE OIL SPILL SITE

by John C. Harshbarger (*), Sara V. Otto (**) and Sing Chen Chang (*)

SUMMARY

Of twenty previously unreported proliferative lesions found among the 20,000 American oysters, *Crassostrea virginica*, surveyed from the Maryland portion of the Chesapeake Bay over the past 14 years, 12 were hematopoietic neoplasms, two were undifferentiated sarcomas, two were germinomas, and four were cryptic mantle hyperplasias resembling adenomas. Several animals also had a gill hyperplasia. One soft-shell clam, *Mya arenaria*, from the Chesapeake Bay had a teratoid anomaly. Two types of intranuclear inclusion bodies were found in a population of *M. arenaria* from Searsport, Maine, which has a prevalence of germinomas ranging up to 22 % and directly correlated with a 1971 spill of N°. 2 fuel oil and JP 5 jet fuel. One type of inclusion which occurred in non-tumorous clams contained a papova virus. The other type of nuclear inclusion was found only in tumor cells, but its viral nature has not been confirmed.

ALTERATIONS PROLIFERATIVES CHEZ *CRASSOSTREA VIRGINICA* ET *MYA ARENARIA* DU BAIE DE CHESAPEAKE ET INCLUSIONS NUCLEAIRES RESSEMBLANT A DES VIRUS DANS *MYA ARENARIA* AVEC DES GERMINOMAS D'UN SITE A SPILL DE PETROLE DANS LE MAINE

RESUME

Des vingt lésions prolifératives non encore signalées à partir de 20 000 huîtres américaines *Crassostrea virginica* prelevées en Maryland du Baie de Chesapeake durant 14 ans, 12 sont des néoplasmes de l'organes hématopoietique, deux sont des sarcomes non différentiées, deux sont des germinomas et quatre sont des hyperplasées du manteau resemblant à des adenomas. Plusieurs animaux ont également eu des hyperphasies des branchies. Une *Mya arenaria* du baie de Chesapeake avait une anomalie seratologique. Deux formes d'inclusions nucléaires furent trouvées dans une population de *M. arenaria* de Searsport, Maine, ayant un taux de germinomas jusqu'à 22 % et directement en rapport avec un en 1971 du fuel N°2 et du fuel JP5. Une forme d'inclusions dans des coquillages sans tumeurs a renfermé un papovavirus. L'autre forme d'inclusions nucléaires a été trouvée dans des cellules tumorales mais leur nature n'a pas pu être établie.

(*) Registry of Tumors in Lower Animals, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D.C., 20560, U.S.A.

(**) Maryland Department of Natural Resources, Fisheries Administration, State Laboratory, Oxford, Maryland, 21654, U.S.A.

We thank L. Cullen and J. Hammed for technical assistance, and P. Schellenger for clerical and editorial assistance. Supported in part by NIH contract NO1-CB-33874, FDA contract 223-74-2129, U.S. Department of Commerce contract NOAA 76051402, and State of Maryland Fisheries Administration project 3-188-R.

INTRODUCTION

The Registry of Tumors in Lower Animals (RTLA) has been cataloging neoplasms and related anomalies in cold-blooded vertebrate and invertebrate animals for 11 years. Nearly one-fifth of the total accessions are bivalve mollusks, approximately two-thirds (220+) of which had neoplastic lesions. Included in these bivalve accessions are 20 previously unreported neoplasias and hyperplasias in *C. virginica* and one teratoid anomaly in *M. arenaria* from the Chesapeale Bay. Also included are several hundred *M. arenaria* from a population with a high prevalence of germinomas from an oil spill site in which two types of virus-like nuclear inclusions have been found.

MATERIALS AND METHODS

During the last 14 years, 20,000 *C. virginica* and 2,400 *M. arenaria* were collected from 23 and 5 areas of the Maryland portion of the Chesapeake Bay respectively (Otto et al. 1978). Since 1971, *M. arenaria* were also collected in Searsport Bay, Maine, at varying distances from the discharge of a land based spill of N°. 2 fuel oil and JP 5 jet fuel. All bivalves were processed routinely for histopathology.

NEOPLASIAS AND HYPERPLASIAS IN CHESAPEAKE BAY OYSTERS

Twenty animals having one of four different types of neoplasias or hyperplasias were from ten collecting sites scattered over virtually every region of the Maryland portion of the Chesapeake Bay, but tending to be clustered in the southeastern region (Fig. 1).

Hematopoietic neoplasms : This collection of 12 cases (represented by Fig. 2) was generally similar to hematopoietic oyster neoplasms described by Couch (1969), Farley (1969) and Frierman (1976). They were composed of an extensive, widespread population of loose, mitotically active, atypical cells believed to be of hematocytoblast origin. These cells have large basophilic nuclei, scant cytoplasm, and a variable size range with an average diameter somewhat larger than hyaline hemocytes. A given field may show a loose infiltration, a micro colony, a packed vessel, or a dense monotonous field of tumor cells. The condition is accompanied by destruction of normal tissue.

Undifferentiated sarcomas : Two oysters contained micro colonies of loose, mitotically active, round to oval cells located in perivascular and periintestinal connective tissue (Fig. 3). Based on their appearance, lack of differentiation, and connective tissue location, the tumor cells were believed to be of mesenchymal origin and the lesion was interpreted as an undifferentiated sarcoma. A similar case was described by Newman (1972).

Germinoma : All gonadal follicles in these two oysters were packed with mitotically active, undifferentiated germ cells or gametoblasts (Fig. 4) similar to a case described by Farley (1976). These cells had large basophilic nuclei containing a prominent nucleolus and scant cytoplasm. Many of the follicular walls had been destroyed and the germ cells were dispersed in connective tissue and blood sinuses. The ciliated wall of the outer follicles, however, were usually intact. An extensive generalized hemocytosis was also present, but it is not known if this was due to the gonadal lesions, the presence of *Polydora* sp. parasites, or some other factor. In conclusion, this condition was interpreted as a germinoma accompanied by hemocytosis.

Hyperplasia of gill and mantle epithelium : Four oysters had deep crypts lined by an continuous with the mantle epithelium. Similarly lined vesicles were present within the connective tissue producing a glandular or adenomatous pattern (Fig. 5). Some, if not all, of these vesicles were undoubtedly connected to the surface and thus represented a portion of a crypt out of the plane of section. The lining cells resembled normal mantle epithelium and the condition was interpreted as a hyperplasia. Several oysters also showed a marked hyperplasia of gill epithelium (Fig. 6) producing an enlarged segment of normally oriented gill structures. This is a commonly observed condition of unknown significance in bivalves, but which has been shown to be associated with high levels of pesticides in some fish studies (Eller, 1975).

A TERATOID ANOMALY IN *MYA ARENARIA*

This large, unusual lesion contained various types of randomly oriented tissues including muscle, nerve, and glandular epithelium some of which contained an undetermined product in the lumens (Fig. 7). Both cytoplasmic and nuclear inclusions were present. Based on the apparent representation of tissue from all three germ layers, the lesion was interpreted as a teratoid anomaly. Hopefully, studies of the fine structure now underway will further elucidate its nature and the nature of the inclusions.

VIRUS-LIKE INCLUSIONS IN *MYA ARENARIA*

Histopathologic surveys of *M. arenaria* surviving and repopulating the oil spill site up to the present time have revealed an intense proliferation of undifferentiated germ cells which fills gonadal follicles, breaks through into interfollicular spaces, and spreads throughout the animal destroying normal tissues (Yevich and Barszcz, 1976, 1977). The condition is interpreted as a germinoma (neoplasm of germ cell origin). The prevalence of affected clams incrementally decreases from a high of 22 % at the epicenter of the spill to zero outside of Searsport Bay. Recently, we have found two types of virus-like intranuclear inclusions in clams from this area. One type filled the nucleus and marginated

the chromatin of non-tumorous cells resembling atypical amoebocytes (Fig. 8) and contained non-enveloped particles 55 nm in diameter resembling papova virus. The second type occupied less than one-half the nuclear space of germinoma cells (Fig. 9). A study of the fine structure is just getting underway so the suspected viral nature of these tumor cell inclusions has not been confirmed.

DISCUSSION

As in vertebrates, proliferative lesions in oysters and clams involve various cell types and tissue systems. Some appear as well differentiated, reversible hyperplasias. Others undergo neoplastic transformation characterized by anaplastic, mitotically active cells with large basophilic nuclei that invade and destroy normal tissue, spread throughout the host, and cause death.

The cause is not known for any bivalve neoplasm, but the correlation of *M. arenaria* germinoma with the site of a spill of fuel oil and jet fuel, suggests that some fraction of or additive to these refined petroleum products could be a factor. However, the discovery of virus-like inclusions in the germinoma cells suggests the additional possibility that the germinoma has a viral etiology which may or may not be facilitated by the stress of the oil spill.

REFERENCES

COUCH J.A., 1969 - An unusual lesion in the mantle of the American oyster, *Crassostrea virginica. Natl. Cancer Inst. Monogr. 31* : 557-562.

ELLER L.L., 1975 - Gill lesions in freshwater teleosts. In Ribelin, W.E. and Migaki, G. (Eds.), *The Pathology of Fishes*, 305-330. University of Wisconsis Press, Madison.

FARLEY C.A., 1969 - Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas. Natl. Cancer Inst. Monogr., 31* : 541-555.

FARLEY C.A., 1976 - Proliferative disorders in bivalve mollusks. *Mar. Fish. Rev., 38*, (10) : 30-33.

FRIERMAN E.M., 1976 - Occurence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters *(Crassostrea virginica). Mar. Fish. Rev., 38* (10) : 34-36.

NEWMAN N.W., 1972 - An oyster neoplasm of apparent mesenchymal origin. *J. Natl. Cancer Inst., 48* (1) : 237-243.

OTTO S.V., HARSHBARGER J.C. and CHANG S.C. - This journal.

YEVICH P.P. and BARSZCZ C.A., 1976 - Gonadal and hematopoietic neoplasms in *Mya arenaria*. *Mar. Fish. Rev.*, *38* (10) : 42-43.

YEVICH P.P. and BARSZCZ C.A., 1977 - Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *298* : 409-426.

LEGEND

Fig. 1 - Chesapeake Bay sources of 20 *C. virginica* with proliferative diseases : A = cryptic mantle hyperplasia ; D = germinoma : H =hematopoietic neoplasm (the "H" in Chincoteague Bay represents an oyster, originally from Chesapeake Bay, that had been translocated and held in a study tray for 1.3 years) ; and, V = undifferentiated sarcoma.

Fig. 2 - Hematopoietic neoplasm in *C. virginica*. Tumor cells clogging a blood vessel and infiltrating adjacent connective tissue (RTLA 1757). 150 X.

Fig. 3 - Undifferentiated sarcoma in *C. virginica*. Tumor cells in connective tissue adjacent to gut (RTLA 1964). X 150.

Fig. 4 - Germinoma in *C. virginica*. Outer ciliated follicular epithelium intact. Mitotically active tumor cells have destroyed inner follicular wall and migrated into adjacent connective tissue (RTLA 1748). X 600.

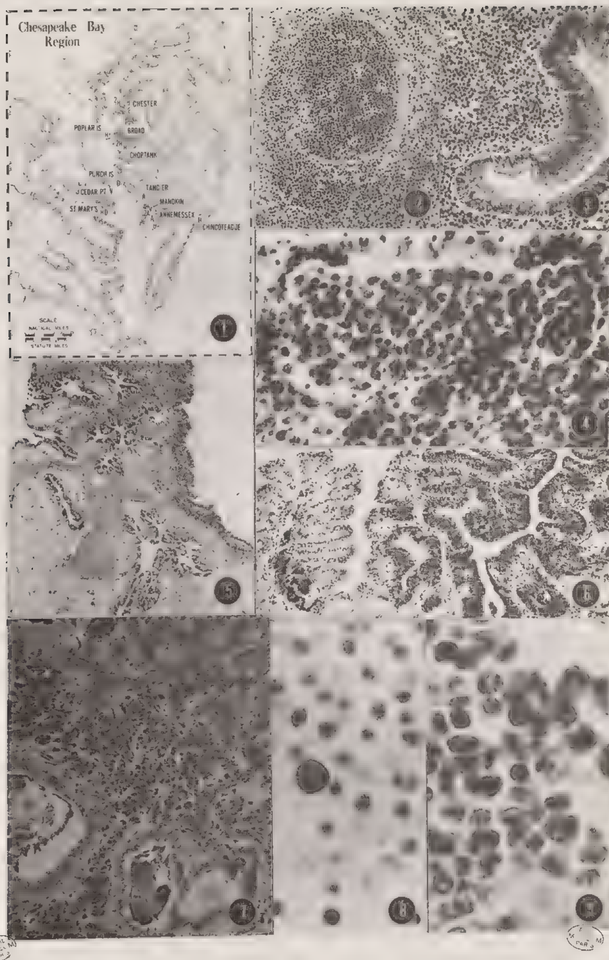
Fig. 5 - Cryptic epithelial hyperplasia in *C. virginica*. Segments of crypts, which have been isolated by sectioning, have an adenomalike appearance (RTLA 1755). X 60.

Fig. 6 - Gill hyperplasia in *C. virginica*. Normal filament of left contrasts with hyperplastic filaments on right (RTLA 1756). X 150.

Fig. 7 - Teratoid anomaly in *M. arenaria* from Tilghman Point, Chesapeake Bay. Numerous epithelial lined vessels are clearly distinguishable. Not clearly shown are other tissues from all three germ layers and three types of intracellular inclusions (RTLA 1381). X 100.

Fig. 8 - Nuclear inclusion, large cell mid left, in *M. arenaria* from Searsport, Maine, oil spill site. Inclusions occupy virtually entire nucleus marginating the chromatin. Affected cells resemble amoebocytic hemocytes (RTLA 1458.4) X 1 500.

Fig. 9 - Nuclear inclusions in germinoma cells in *M. arenaria* from Searsport, Maine, oil spill site. Inclusions occupy about one third of nucleus and are haloed. Cell mid left has best focus (RTLA 1453.20). X 1 500.


Chesapeake Bay Region
CHESTER
POPLAR IS
BROAD
CHOPTANK
PUNCH IS
CEDAR PT
TANGIER
MANOKIN
ANNEMESSEX
ST MARY'S
CHINCOTEAGUE
SCALE
NAUTICAL MILES
STATUTE MILES

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 249 à 253

CONCURRENT NEOPLASTIC AND PROTISTAN DISORDERS IN THE AMERICAN OYSTER (*CRASSOSTREA VIRGINICA*)

by John A. Couch(*) and James T. Winstead(**)

SUMMARY

One of 373 oysters examined as part of a histological survey of oysters from Apalachicola Bay, Florida, USA, had a concurrent blood cell proliferative disorder and a protistan infection. The neoplastic blood cells (leukocytes) were found throughout the vesicular connective tissues and blood spaces in sections of the oyster. These proliferating cells resembled the neoplastic cells described by Couch (1969) and Farley (1969) from other specimens of *Crassostrea virginica* from Chesapeake Bay, Maryland, USA. Mitotic figures were abundant in foci of the neoplastic tissue. Epithelial tissues of the gut of this oyster were infected by spore and schizogonic stages of *Dermocystidium marinum*, a presumed pathogenic protist of oysters. Spores of this protist and other proliferative stages were observed in connective tissues and blood spaces. There was no morphological evidence that the neoplastic blood cells were related to the protist life cycle stages.

ALTERATIONS CONCOMITTANTES D'ORIGINE NEOPLASIQUE ET A PROTISTES CHEZ L'HUITRE AMERICAINE (*CRASSOSTREA VIRGINICA*)

RESUME

Chez l'une des 373 huîtres examinées dans le cadre d'un échantillonnage pour histologie dans le baie d'Apalachicola, Floride, USA, a été notée la présence concomittante d'une prolifération hémocytaire et d'une infection à protiste. Les cellules sanguines neoplasiques (leucocytes) ont été trouvées dans le tissu connectif et les volumes de sang sur des coupes de l'huitre. Ces cellules ressemblent à celles décrites par Couch (1969) et Farley (1969) d'autres exemplaires de la même huitre provenant du baie de Chesapeale, Maryland, USA. Les figures de mitose sont nombreuses au sein du tissu néoplastique. Le tissu épithélial de l'intestin est infecté par des spores et des stades de schirogonie de *Dermocystidium marinum*, protiste présumé parasite d'huitres. Spores et autres stades sont observés dans le tissu connectif et le sang. Aucun signe histologique ne permet de montrer une relation entre les cellules sanguines néoplasiques et les stades du protiste.

(*) U.S. Environmental Protection Agency Environmental Research Laboratory Gulf Breeze, FL 32561 (USA)

(**) University of Southern Mississippi Biology Department Box 477 Hattiesburg, MS 39401 (USA)

The occurrence of neoplastic disorders in bivalve mollusks is not uncommon. Pauley (1969) reviewed numerous cases of non-invasive tumorous growths in different species of bivalves and Farley and Sparks (1970), in a review of proliferative diseases of tissue cells in mollusks, reported that leukemia-like, invasive neoplasms have been discovered in about 40 specimens from 1961 to 1970. Since 1970 a few more cases of the bivalve, hemotopoietic disorder have been reported (Newman, 1972 ; Mix, 1975). The prevalence of the disease in both *Mytilus edulis* and *Ostrea lurida* examined has been found to be as high as 12 % (Farley and Sparks, 1970) but, the occurrence of leukemia-like disorders in the genus *Crassostrea* is rare. Couch (1969) and Farley (1969) have documented the only examples in *Crassostrea* with neoplastic, leukemia-like features. The purpose of this paper is to report one of 373 oysters (*Crassostrea virginica*), examined as part of a histological survey for oyster diseases, which had a concurrent blood cell proliferative disorder and protestan infection.

Oysters were obtained live from Apalachicola Bay, Florida, USA. Transverse cuts of 1 cm., including a portion of gills, digestive tubules and gonads, were taken from the anterior region of each oyster. These were fixed with Davidson's fluid, dehydrated with a graded series of ethanol and embedded in Paraplast. Histologic sections of 7 µm were cut and stained with Harris' hematoxylin and eosin for examination.

The cellular proliferation was very diffuse and consisted of neoplastic, hyaline leukocyte-like cells located in blood sinuses and throughout the vesicular connective tissues in the body, gills and mantle (Fig. 1,2, 3). Epithelial tissue, lining the gut and mantle, was not invaded by the neoplastic-like cells. Pycnosis and nuclear lysis were more pronounced in areas of heaviest invasion. The proliferative cells had a larger nuclear to cytoplasmic ratio compared to the oyster's normal cells (Fig. 4). Mean nuclear diameter was 4.7 µm with a range of 3 µm to 6 µm. From three to eight mitotic figures (mean of 4.6), per oil immersion field, could be seen in foci of the neoplastic tissue. Most of the dividing cells were in anaphase and metaphase (Fig. 4). Numerous cell divisions are considered unusual for normal postlarval oysters.

The proliferating cells resembled the neoplastic cells described by Couch (1969), and Farley (1969) from other specimens of *Crassostrea virginica* from Chesapeake Bay, Maryland, USA. Both authors considered the neoplastic-like cells they observed as hematopoistic neoplasms and analogous to mammalian sarcoma or leukemia.

In addition to the cellular, proliferative disorder, a heavy infection of *Dermocystidium marinum*, a presumed pathogenic protist of *Crassostrea virginica* (Ray, 1954) was present. Mature spores, with characteristic small nuclei, vacuoplasts within large, eccentric vacuoles and multicelled shizogonic stages were observed in blood sinuses and vesicular connective tissue. Epithelial tissues of the gut were also heavily infected by schizogonic and spore stages of the parasite (Fig. 4). Both protist and neoplastic cells were observed in close proximity in vesicular connective tissue of the oyster. At no time were both cell types seen together in the epithelial tissue of the gut.

A few investigators have suggested that the so-called hematopoetic neoplasms of oysters are nothing more than undescribed stages in the life cycle of a protist such as *Dermocystidium marinum*. There have been enough cases of these neoplasms documented which indicate that the vast majority occur without the presence of known stages of the protistan parasite. The present case is the first for oysters in which both the neoplasm and protistan stages were found together and study indicates that there is no morphological evidence that the two conditions are related.

REFERENCES

COUCH J.A., 1969 - An unusual lesion in the mantle of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Nat. Cancer Inst. Monogr. 31* : 557-562.

FARLEY C.A., 1969 - Probable neoplastic disease of the hematopoietic systems in oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*). *Nat. Cancer Inst. Monogr., 31*, 541-555.

FARLEY C.A. and SPARKS A.K., 1970 - Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells, and connective tissue cells in mollusks. Comparative leukemia research. *Bibl. Haematol., 36*, 610-617.

MIX M.X., 1975 - Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters *(Ostrea lurida)* from Yaquina Bay, Oregon. *J. Invertebr. Pathol., 26*, 289-298.

NEWMAN M.W., 1972 - An oyster neoplasm of apparent mesenchymal origin. *J. Nat. Cancer Inst., 48*, 237-243.

PAULEY G.B. 1969 - A critical review of neoplasms and tumor-like lesions in mollusks. *Nat. Cancer Inst. Monogr., 31*, 509-539.

RAY S.M. 1954 - Biological studies of *Dermocystidum marinum*. A fungus Parasite of Oysters. In, *The Rice Institute Pamphlet*. Rice Institute.

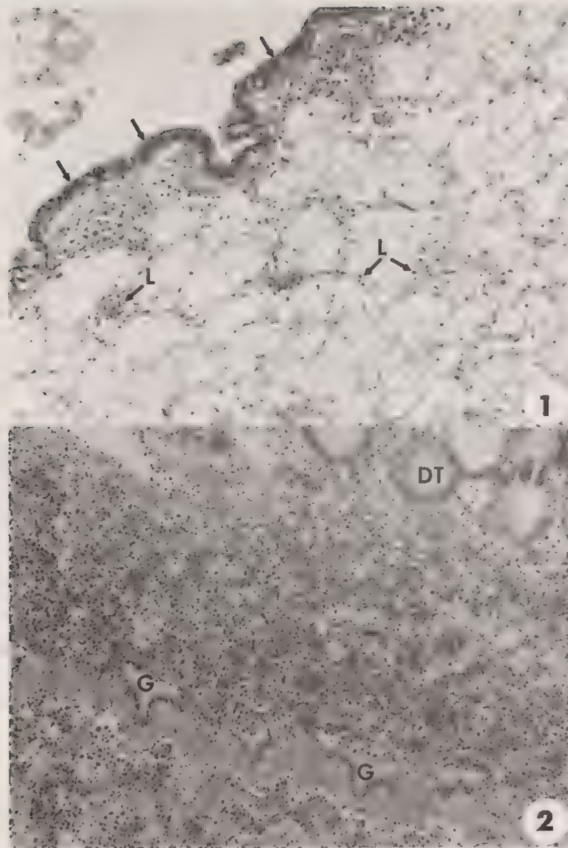


Fig. 1 - Normal vesicular connective tissue of oyster with leukocyte (L) located in blood sinuses between vesicular cells. Note small portion of epithelium of mantle (arrows). X 350.

Fig. 2 - Neoplastic invasion of vesicular connective tissue in an around gonadal (G) region and digestive tubules (DT). X 140.



Fig. 3 - Neoplastic invasion of right mantle. X. 140.

Fig. 4 - Neoplastic cells in vesicular connective tissue concurrent with schizogonic (SG) and spore (S) life stages of *Dermocystidium marinum* located in gut epithelium of oyster. Note mitotic figure (M) and the larger size of neoplastic cells (N) compared to normal leukocyte cells (arrows). X 1 250.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 255 à 262

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LA PATHOLOGIE DES GASTEROPODES

par Gérard Meynadier (*)

RESUME

En dépit de l'importance des gastéropodes, les connaissances sur leur pathologie sont très limitées. Il est fait rarement mention de maladies épizootiques et très peu de germes pathogènes ont été isolés parmi les bactéries, les protozoaires et les champignons.

Jusqu'à maintenant, aucune rickettsie, aucun virus n'ont été décrits chez les gastéropodes, alors que l'action pathogène de ces micro-organismes est reconnue chez nombre d'invertébrés terrestres et aquatiques.

PRESENT STATUS OF GASTROPOD PATHOLOGY

SUMMARY

In spite of importance of Gastropods, the knowledge of their pathology is very limited. Epizootic diseases have rarely been recorded and only a very few pathogenic germs have been isolated essentially bacteria, protozoa and fungi.

So far, no rickettsia or virus have been described in Gastropods whereas the pathogenicity of both type of microorganisms is known in many terrestrial and aquatic invertebrate.

INTRODUCTION

Depuis une cinquantaine d'années et surtout au cours des vingt dernières, une somme considérable de connaissances a été accumulée au sujet des maladies des arthropodes, de l'isolement et du mode d'action des agents pathogènes responsables. Par contre, les études des maladies des mollusques reprennent un essor depuis seulement quelques années. Chez les lamellibranches, elles ont apporté quelques renseignements et donné une explication à diverses maladies constatées dans les élevages d'huîtres ou de moules dont l'importance économique n'est pas à souligner.

En ce qui concerne les maladies des gastéropodes, peu d'entre elles ont été caractérisées et peu de germes pathogènes très efficaces ont été mis en évidence et étudiés. Pourtant, de nombreux travaux ont été consacrés à ce groupe zoologique qui possède un intérêt économique mais aussi biologique, beaucoup d'entre eux jouant un rôle primordial dans la trans-

(*) Station de Recherches de Pathologie Comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S., 30380 Saint-Christol (France)

mission de maladies de l'homme ou des animaux par leur rôle vecteur de nombreux parasites. L'isolement et la connaissance des agents pathogènes pour les gastéropodes peut aider à une meilleure interprétation de certaines maladies sévissant dans les élevages ou en nature ; on est d'autre part en droit d'envisager l'utilisation de certains d'entre eux pour combattre les vecteurs par des moyens biologiques comme cela a été déjà réalisé parfois dans le domaine agricole.

Même si l'on reconnaît qu'un parasite peut exercer une action parfois néfaste sur son hôte intermédiaire, il ne nous appartient pas de traiter, même d'une façon rapide, des rapports qui s'établissent alors entre le mollusque et le parasite au cours des transformations de celui-ci. Ces relations font l'objet des travaux de plusieurs chercheurs parmi lesquels nous nous devons de citer Pan (1965), Reader (1971), Cheng et Alicata (1965), Cheng et al. (1973), Michelson et Dubois (1973), Christie et al. (1974), Edges et al. (1975), enfin Lie et al. (1977) et Krupa et al. (1977).

Proches encore des études pathologiques, une autre série de recherches concerne les malformations ou les tumeurs décelées chez les escargots. Michelson et Ricgards (1975) en font une synthèse pour *Biomphalaria glabrata*. La plupart d'entre elles peuvent être considérées comme des excroissances originales mais certaines constituent, en fait, le résultat des réactions de défense de l'hôte à la présence d'un micro-organisme se comportant comme un corps étranger. De tels phénomènes ont été étudiés entre autres par Mead (1956), Nolte (1962), par Michelson (1972) chez *Helix pomatia* et *Achatina fulica*.

Des germes appartenant à seulement trois des groupes d'agents pathogènes classiques affectent les gastéropodes ou y ont été rencontrés ; il s'agit des bactéries, des champignons et des protozoaires. A des degrés divers, ils sont responsables de maladies, d'altérations tissulaires, ou sont tolérés par leurs hôtes sans y créer des lésions ou des troubles contrôlables. Successivement, nous évoquerons les cas des bactéries, des champignons, enfin des protozoaires signalés ou étudiés.

SIGNALEMENT DE BACTERIES

Les bactéries vivent et se développent dans tous les milieux et, en pathologie, elles ont une action très importante. Parfois, elles jouent seulement le rôle de germes de sortie et masquent ainsi la cause ou le germe responsable de la maladie ; de plus, se développant sur les animaux en décomposition, elles rendent, là encore, le diagnostic difficile.

Certaines d'entre elles ont été isolées à partir de différents gastéropodes mais leur action pathogène n'a pas été souvent démontrée avec rigueur.

A leur sujet, une bactérie provoquant une épizootie dans les élevages de *Biomphalaria glabrata* avait fait l'objet d'un travail de Berry (1949). Même si cette bactérie n'a pu être ni déterminée ni conservée, elle mérite cependant d'être mentionnée. Elle s'était, en effet, montrée pathogène pour plusieurs espèces de gastéropodes aquatiques et, de plus,

entraînait un gonflement des extrémités des tentacules, une nécrose des tissus et un écoulement d'hémolymphe.

Des espoirs avaient été un temps fondés sur l'annonce, par Cruz et Diaz (1953), de l'action d'une bactérie sporogène nommée *Bacillus pinottii* provoquant une excroissance du pied de *Biomphalaria glabrata*. A la suite des travaux de Tripp (1961), il est apparu que son action pathogène était en fait très faible.

La note de Michelson (1961) relate l'isolement et l'étude d'une bactérie acido-résistante, un *Mycobacterium*. Il en obtient la culture et infecte expérimentalement diverses planorbes. Cette bactérie déclenche des phénomènes de défense cellulaire et se manifeste encore par un gonflement en massue des extrémités des tentacules. On avait espéré utiliser ce *Mycobacterium* comme agent dans la lutte biologique mais le taux de mortalité trop faible n'a pas permis la réalisation de ce projet.

En ce qui concerne les escargots terrestres, quelques cas peuvent être mentionnés dans lesquels les bactéries ont été reconnues responsables d'épizooties. Un tel cas est signalé (Meynadier et al., 1964) sur *Helix aspersa*, relatant l'isolement d'une bactérie Gram négative appartenant au genre *Pseudomonas*. Elle entraîne une certaine mortalité dans les élevages de cet escargot comestible. Ses caractéristiques bactériologiques la rapprochent de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière n'est en fait pas liée uniquement aux escargots puisqu'on la rencontre dans les matières organiques, les animaux vertébrés ou les insectes. Chez ceux-ci, elle est plus considérée comme un agent pathogène facultatif car elle sévit dans les élevages soumis à de mauvaises conditions. D'après les essais d'infection qui avaient été pratiqués, ce caractère apparaît chez les escargots. En effet, une culture pure de ce *Pseudomonas* entraîne une mortalité différée de 3 à 5 jours après inoculation ; par contre, après ingestion, les escargots bien alimentés ne meurent que dans une très faible proportion alors que le taux de mortalité peut s'élever à 20 % si les escargots sont soumis à de mauvaises conditions d'alimentation, d'hygrométrie et de température élevées.

Poursuivant les travaux sur *Achatina fulica*, Mead et al. (1966) ont, de leur côté, rapporté le rôle pathogène d'une bactérie du genre *Aeromonas*.

Enfin, lors de la dernière réunion de la Société de Pathologie des Invertébrés, Bayne et Boman ont présenté une note consacrée à la mise en évidence d'une bactérie Gram négative pour *Helix pomatia* sur laquelle nous ne possédons encore aucun renseignement, concernant ni son mode d'isolement ni le site de multiplication ni même le rôle épizootique.

SIGNALEMENT DE CHAMPIGNONS

Les champignons sont des agents pathogènes actifs vis-à-vis de nombreux invertébrés. Il aurait semblé que leur rôle pourrait être considérable contre les escargots aquatiques ou terrestres étant donné leur habitat et leur mode de vie. Or, les renseignements fournis par

la littérature sont encore succincts et assez vagues. Plusieurs concernent les attaques des oeufs par les champignons, soit que ces oeufs aient été infectés avant la ponte, soit après la ponte.

Ainsi, Gain (1896) fait mention de l'observation de Laurent signalant l'infection d'oeufs de la limace *Deroceras reticulatum* par un champignon et ceci avant même la ponte. Par la suite, Tervet et Esslemont (1938) ont isolé, chez la même limace et dans les mêmes conditions, le champignon *Verticillium chlamydosporum* qui semblait exercer une action puissante comme facteur de limitation de population. Ce mode d'action nous semble se rapprocher de l'observation que nous rapportons au sujet des "pontes roses" d'*Helix aspersa* infectées par un *Fusarium*. (Meynadier et al. sous presse).

Dans leur milieu naturel, les oeufs de *Biomphalaria boissyi* et de *Bulinus truncatus* seraient sensibles aux attaques d'un champignon imparfait (Malek, 1952) comme ceux de *Biomphalaria glabrata* le sont à celles d'un *Catenaria*. On remarque que les blastocladiales du genre *Catenaria* sont connues comme des champignons saprophytes mais aussi comme des parasites se développant aux dépens d'oeufs d'animaux aquatiques.

Les escargots sont eux-mêmes probablement parasités par des champignons car Lovett et Blacx (1920) décrivent l'action néfaste de l'un d'eux dans les élevages de la limace *Agriolimax agrestis* alors que ce champignon se révélait pratiquement inopérant dans les conditions naturelles. Enfin, dans son étude histologique de 1956, Pan signale l'existence, chez *Biomphalaria glabrata*, d'un mycélium ou d'une levure dans le système nerveux et le tissu conjonctif perturbé par l'hyperplasie des amibocytes.

SIGNALEMENT DE PROTOZOAIRES

Les protozoaires ont été identifiés dans tous les biotopes et leur rôle en tant que parasites ou d'agents pathogènes est connu pour nombre d'invertébrés. Certains sont tolérés par leurs hôtes tandis que d'autres causent des maladies graves et transmissibles aux générations suivantes.

Chez les gastéropodes, ils ont été observés il y a déjà longtemps. Ces protozoaires appartiennent à diverses classes et ont été rencontrés dans les différents organes sans que leur description soit souvent liée à un état pathologique déterminé.

Ainsi, dès 1846, Letdy reconnaissait la présence d'une protomonadine *Cryptobia helicis* dans l'appareil génital de *Triodopsis albolabris*, *T. tridentata* et *Anguispira alternata*, tandis que Kosloff (1946-1948) l'identifiait chez *Helix aspersa* et *Monodenia fidelis*. De même Kosloff (1945) avait observé *Trichomonas limacis* dans l'intestin et l'hépatopancréas de *Limax flavus* alors que Dujardin (1841) l'avait déjà décelé chez *Deroceras agreste*.

Hollande et Chabelard (1953) avaient envisagé l'utilisation du flagellé *Demoriopsis destructor* contre les vecteurs après avoir isolé ce micro-organisme dans les élevages de

Biomphalaria, Lymnaea et *Bulinus*.

Deux coccidies *Eimereidae* : *Pfeifferinella ellipsoides* et *P. impudica* sont signalées comme parasites de l'hépatopancréas de *Planorbis corneus* et de *Limax marginatus*. Quant à la coccidie *Adeleidae*, *Klossia helicina*, elle a été étudiée par Nabih (1938) dans le rein de divers gastéropodes terrestres appartenant aux genres *Helix*, *Succinae* et *Vitrina*.

Deux amibes, *Hartmannella biparia* et *H. quadriparis*, ont été observées. On peut les considérer comme facultativement pathogènes. Elles peuvent causer des réactions de défense des cellules sanguines de l'hôte, en formant des "tumeurs" au niveau des différents organes de *Bulinus globosus* et de *Biomphalaria pallida* (Richards, 1969). Cet auteur a tenté, au laboratoire, d'infecter avec un certain succès différents autres gastéropodes au moyen de ces protozoaires.

En ce qui concerne les ciliés holotriches, quelques cas sont connus : Reynolds (1936) décrit *Colpoda steinsi* dans divers organes de la limace *Agriolimax agrestis* tandis que Kosloff (1946) observe *Tetrahymena limacis* avec une localisation semblable chez *Deroceras agreste*. Parmi les ciliés péritriches, *Urceolaria paradoxa* et *U. karyolabris* sont signalés dans la cavité palléale de *Cyclostoma elegans* et des patelles (*Lottia gigantis* et *Acmaea* ssp.).

Les microsporidies jouent un rôle important comme parasites de divers animaux et des insectes en particulier. Or, c'est en 1963 que Michelson étudie pour la première fois l'action d'un micro-organisme de ce groupe, *Plistophora husseyi*, sur divers gastéropodes. Une action pathogène nette est observée sur des Physes infectées expérimentalement. La microsporidie se développe aux dépens des différents organes, provoquant des modifications tissulaires, une baisse de la fécondité et un taux de mortalité variant de 30 à 60 % dans les conditions expérimentales. Malheureusement, les essais d'infection de vecteurs : *Biomphalaria glabrata*, *Bulinus truncatus*, *Helisoma caribanum* ou même d'insectes diptères comme *Aedes* et *Anopheles* se sont soldés par des échecs.

Chez *B. glabrata*, Richards et Scheffield (1970) avaient identifié *in vivo* une *Coccospora*. Enfin, deux autres microsporidies ont été isolées lors de la mise en culture de certaines cellules embryonnaires (Basch et Di Conza, 1973) ou de jeunes escargots (Bayne et al., 1975). On ne peut encore préjuger de leur mode d'action mais des espoirs peuvent être fondés en vue de l'utilisation ultérieure de ces germes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

A l'énoncé de ce rapport, il apparaît que les escargots terrestres ou aquatiques se caractérisent à la fois par leur pauvreté en agents pathogènes efficaces et par de remarquables moyens de défense. Ils sont, en effet, capables de tolérer ou d'enkyster divers micro-organismes et entraînent ainsi la formation de "tumeurs". En outre, dans le domaine des réactions de type "humoral", la mise en évidence de protéines présentant les caractères du lysozyme est à signaler (Cheng et al., 1977).

Les plus agressifs des micro-organismes pathogènes paraissent être quelques bactéries ; pourtant, la plupart doivent agir dans certaines conditions de milieu défavorable, elles sont donc à considérer plus comme des agents pathogènes facultatifs.

Les champignons exercent leur action bien plus souvent aux dépens des oeufs déjà pondus que des escargots eux-mêmes ; quant aux protozoaires, nombre d'entre eux se rencontrent dans les cavités de ces gastéropodes et n'exercent pratiquement pas d'action pathogène ; certains pénètrent dans les organes où ils sont tolérés grâce aux réactions de défense cellulaire ou humorales. Les microsporidies sont probablement plus efficaces mais leur action mérite d'être encore étudiée ; en effet, même si elles n'entraînent qu'un taux de mortalité relativement limité, elles peuvent jouer un rôle par exemple dans la lutte contre les maladies transmises en raison des interactions entre le vecteur et ses parasites.

De nouveaux essais et de nouvelles découvertes aideraient à disposer d'un éventail de germes plus vaste ou mieux adapté pour tenter de les utiliser dans la lutte biologique. D'un autre côté, une meilleure connaissance des maladies et des agents pathogènes apporterait une aide aux éleveurs dans la conduite des élevages d'escargots.

Il est enfin probable que d'autres germes appartenant à d'autres groupes sévissent parfois soit en nature, soit dans les élevages et qui ont échappé encore à notre observation. Parmi eux, les rickettsies sont peut-être présentes, mais plus probablement les virus dont nous n'avons mentionné aucun représentant au cours de ce rapport. Ce manque incite à rechercher de tels micro-organismes, surtout dans les élevages où se manifestent des maladies mais où peut-être leur action est masquée par la sortie de germes eux-mêmes non pathogènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BASCH P.F., DI CONZA J.J., 1973. - Primary cultures of embryonic cells from the snail *Biomphalaria glabrata*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg*, *22* : 805-813.

BAYNE C.J., OWCZARZAK AM, NOOMAN W.E., 1975. - *In vitro* cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata : Basommatophora) in Pathobiology of invertebrate vectors of disease. Lee A. Bull. Jr. and Th. C. Cheng Ed. *Ann. of N.Y. Acad. Sci.*, *226* : 512-527.

BERRY E.G., 1949. - A recently observed snail disease. *Ann. Rep. Amer. Malacol. Union, News Bull.* : 10-11.

CHENG T.C., ALICATA J.E., 1965. - On the modes of infection of *Achatina fulica* by larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Malacologia*, *2* : 267-274.

CHENG T.C., SULLIVAN J.T., HARRIS K.R., 1973. - Parasitic castration of the marine prosobranche gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonus rubellus* (Trematoda : histopathology. *J. Invert. Pathol.*, *21* : 183-190.

CHENG T.C., CHORNEY M.J., YOSHINO T.P., 1977. - Lysozymelike activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challanged with bacteria. *J. Invert. Pathol., 29* : 170-174.

CHRISTIE J.D., FOSTER W.B., STAUBER L.A., 1974. - The effect of parasitism and starvation on carbohydrate reserves of *Biomphalaria glabrata. J. Invert. Pathol., 23* : 55-62.

CRUZ O., DIAZ E., 1953. - *Bacillus pinottii* sp. n. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 47* : 551-562.

ETGES F.J., CARTER O.S., WEBBE G., 1975. - Behaviorial and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan hosts. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 480-496.

GAIN W.A., 1896. - Enemies of our land and fresh water molluscs. *Naturalist's J.* : 78-79.

HOLLANDE A., CHABELARD R., 1953. - Essai de lutte biologique par *Dimoeriopsis destructor* Hollande et Pesson (protozoaire flagellé) contre les bilharzioses et les distomatoses. *Minerva Urol.* Torino, *5* : 145.

KOSLOFF E.N., 1945. - The morphology of *Trichomonas limacis. J. morphol., 77* : 53.

KOSLOFF E.N., 1946. - The morphology and systematic position of a ciliate paraziting terrestrial pulmonate molluscs. Un publ. thesis. Univ. Calif. Berkeley.

KOSLOFF E.N., 1948. - The morphology of *Cryptobia helicis. J. morphol., 83* : 253.

KRUPA P.L., LEWIS L.M., DEL VECCHIO P., 1977. - *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guernei* : Electron Microscopy of Hemocyte-Sporocyst interactions. *J. Invert. Pathol., 30* : 35-45.

LEIDY J., 1846. - Description of a new genus and species of Entozoa. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia, 3* : 100.

LIE K.J., HEYNEMAN D., RICHARDS C.S., 1977. - Studies on resistance in snails : interference by monirradiated Echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata. J. Invert. Pathol., 29* :

LOVETT A.L., BLACK A.B., 1920. - The gray garden slug with notes on allied forms. *Oregon Agric. Coll. Exp. Sta. Bull., 170* : 1-43.

MALEK E.A., 1952. - Morphology, Bionomics and Host-Parasite relations of *Planorbidae* (Mollusca : Pulmonata) Ph D. Thesis Univ. Michigan. Ann. Arbor.

MEAD A.R., DEAM W.W., KOJIMA E.S., ICHINOSE L.Y., 1956. - *Aeromonas* in the pathology of the giant african snail. *Ann. Rep. Amer. Malacological Union* : 19.

MEYNADIER S., AMARGIER A. et VEY A., 1977 - Etude de la maladie des "pontes roses" du Gasteropode *Helix aspersa. Haliotis* sous presse,

MEYNADIER G., BERGOIN M. et VAGO C., 1964 - Bactériose épizootique chez les Hélicidés (Mollusques). *Antonie van Leeuwenhoek, 30* ; 76-80.

MICHELSON E.H., 1961. - An acid fast pathogen of fresh water snails. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *10* : 423-427.

MICHELSON E.H., 1963. - *Plistophora husseyi* sp. nov., a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snails. *J. Insect. Pathol.*, *5* : 28-38.

MICHELSON E.H., 1972. - A neoplasm in the giant african snail *Achatina fulica*. *J. Invert. Pathol.*, *20* : 264-267.

MICHELSON E.H., DUBOIS L., 1973. - Increased alkaline phosphatase in the tissue and hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *44 b* : 763-767.

MICHELSON E.H., RICHARDS C.S., 1975. - Neoplasms and tumor like growths in the aquatic pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Ann. of N.Y. Acad. Sci.*, *226* : 540.

NABIH A., 1938. - Studien über die Gattung *Klossia* und Beschreitung des Lebenszyklus von *Klossia loossi* (nov. sp.). *Arch. Protistenk.*, *91* (3) : 474-515.

NOLTE A., 1962. - Eine Geschwultsbildung bei *Helix pomatis*. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, *56* : 149-156.

PAN C.T., 1965. - Studies on the host parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabrata*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, *14* : 931-976.

READER T.A., 1971. - The pathological effects of sporocysts, rediae and metacercariae on the digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca : Gastropoda). *Parasitology*, *63* : 483-489.

REYNOLDS B.D., 1936. - *Colpoda steini*, a facultative parasite of the land slug *Agriolimax agrestis*. *J. Parasitol.*, *22* : 48.

RICHARDS C.S., 1968. - Two new species of *Hartmannella* amoebae infecting fresh water mollusk. *J. Protozool.*, *15* : 651-656.

RICHARDS C.S., SHEFFIELD H.G., 1970. - Unique host relations and ultrastructure of a new microsporidian of the genus *Coccospora* infecting *Biomphalaria glabrata*. In Proc. IV Internat. Coll. Insect Pathol. : 439-452.

TERVET I.W., ESSLEMONT J.M., 1938. - A fungous parasite of the eggs of the gray field slug. *Jour. Quekett Microscopical Club London*, 4e ser., *1* (1) : 1-3.

TRIPP M.R., 1961. - *Bacillus pinottii* pathogenic in *Australorbis glabratus* ? *J. Parasitol.*, *47* : 464.

Haliotis, 8, 1977 (1979)
p. 263 à 264

BIOLOGICAL CONTROL OF TERRESTRIAL SNAILS

by Albert R. Mead[*]

SUMMARY

As a contribution to biological control projects a survey has been made of the known organisms producing disease, parasitism or predations in terrestrial snails. The considerable promise and predictable threat to the environment some of these offer as possible agents of biological control are discussed.

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES ESCARGOTS TERRESTRES

RESUME

Dans le cadre de programmes de lutte biologique, ont été recherchés des organismes agents de maladies, parasites ou prédateurs d'escargots terrestres. La potentialité considérable en même temps que la menace pour l'environnement que ces organismes représentent en tant qu'agents de lutte biologique sont discutées.

Control programs directed toward the invertebrate pests of man are currently facing a dilemma. Pressure from environmentalists and public health officials is continuing to restrict control programs involving the use of chemicals. As an alternative, there have been recent intensified attempts to exploit potential biological control agents with often admitted inadequate knowledge of the biology of either the agent or the target species, and limited knowledge of the environmental arena in which the interaction is to take place. This is particularly the case with the introduction of metazoan predators. Both they and their own symbionts may well behave unexpectedly in the new environment.

What is really needed is a repertoire of sophisticated control measures which would have their effects restricted to the target species -- measures involving the use of antimetabolites, pheromone-like substances, hormones, genetic manipulation, biotoxins, aposymbiosis, highly specific and stable pathogens, and intensification of host susceptibility to pathogens.

As a contribution in this direction, a survey has been made listing the known predators, parasites, diseases and neoplasias of terrestrial snails and slugs, including ants, bacteria, beetles, birds, centipedes, crustaceans, flies, flukes (71 species), fungi mammals, millipedes, mites, nematodes (77 species),protozoans (24 species), reptiles, scorpions, snails, tapeworms (18 species) and turbellarians (Mead).

[*] University of Arizona, Office of the Dean, Liberal Arts College
347 Modern Languages Bldg. Tucson, Arizona 85721 (U.S.A.).

Certain of these, such as some of the nematodes, turbellarians and micro-organisms, offer considerable promise as biological control agents, but others in these same categories pose a real threat, directly and indirectly, to the environment and even to public health. Viruses of invertebrates, other than those of insects, are only just beginning to be discovered. These discoveries, plus provocative cases of suspected viral etiology, contribute to the expectation that there will emerge in the relatively near future a whole new branch of biological control wherein greater intrinsic controls may be found. The nematode *Angiostrongylus cantonensis* and the bacterium *Aeromonas hydrophila* are both found in the giant African snail *Achatina fulica* and contribute substantially to the phenomenon of "population decline" in this largest and most widely spread land snail pest. Both parasites, however, are capable of causing serious and even fatal disease in humans as well as in some of the metazoan predators that have been used in the biological control of this pest.

Measures for controlling pestiferous terrestrial snails, for too long, have been largely restricted to a limited selection of destructive or preventative measures through the use of toxicants, physical barriers, traps, hand picking ans destroying, quarantines, and natural enemies. Not only should a broader, more sophisticated and integrated selection of these measures be made, but control measures of a "positive" nature should be taken through the exploitation of these animals for the nutrition of man and domestic animals, for their greater use as provenly excellent experimental animals in the laboratory, and for sources of complex organic substances in biomedical research. In biological control measures in the future, greater emphasis predictably will be placed on the use of parasites and disease agents rather than metazoan predators.

REFERENCE

MEAD, A.R. - Economic Malacology with Particular Reference to *Achatina fulica*. *Pulmonates, 2B*, Academic Press (London) in press.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 265 à 270

ETUDE DE LA MALADIE DES "PONTES ROSES" DU GASTEROPODE *HELIX ASPERSA*

par Gérard Meynadier, Augusta Amargier et Alain Vey (*)

RESUME

Dans des élevages de masse d'*Helix aspersa*, des pontes anormales ont été observées. Les oeufs sont peu turgescents, roses et n'éclosent pas. Les études histologiques et microbiologiques révèlent la présence et le rôle possible d'un champignon Hyphomycète du genre *Fusarium*. L'infection expérimentale des oeufs n'a pu être obtenue ; il semble, d'autre part, que dans les conditions naturelles, l'infection soit antérieure à la ponte.

STUDY OF THE "PINK EGG DISEASE" IN *HELIX ASPERSA*, GASTEROPODA

SUMMARY

Abnormal egg layings have been observed in a mass-rearing of *Helix aspersa*. The eggs are weakly turgescent, pink-coloured ; they do not hatch. Histological and microbiological studies revealed the presence and the possible role of a Hyphomycete fungus belonging to the *Fusarium* genus. The experimental infection of eggs failed and it would seem that in nature the infection precedes the egg laying.

INTRODUCTION

Après sa récolte dans la nature, l'escargot *Helix aspersa* est depuis longtemps maintenu en élevage dans des parcs qui permettent le développement de ces animaux et leur conservation avant leur utilisation ou leur commercialisation. Or, depuis peu de temps, une évolution nouvelle de cet élevage se fait jour et ne vise plus seulement le maintien en survie mais cherche à établir de véritables élevages en bouclant le cycle complet de développement depuis la ponte, l'éclosion et l'acclimatation de jeunes jusqu'à l'obtention de géniteurs. Ces élevages de masse se heurtent parfois à certaines difficultés, ils comportent des risques de maladie mais offrent un champ d'observation et d'étude intéressant.

Dans de tels élevages, il a été constaté que certaines pontes présentent un aspect anormal et qu'elles n'évoluaient pas favorablement. Ce phénomène pouvait revêtir une importance

(*) Station de Recherches de Pathologie Comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S.,
30380 Saint-Christol (France)

au point de vue économique dans la poursuite de l'élevage et certaines pontes anormales nous ont été adressées afin de pratiquer un examen pathologique et de tenter l'établissement d'un diagnostic.

SYMPTOMES

Les symptômes présentés par ces oeufs sont assez nets . Alors qu'une ponte saine d'escargot est constituée par une masse d'oeufs bien individualisés blanc nacré (1), les pontes anormales comportent des masses d'oeufs ayant subi des modifications de couleur. En effet, ils se présentent comme des sphères de teintes différentes (fig. 2) ; la plupart sont colorés en rose plus ou moins foncé mais on peut en discerner des jaunes, des beiges et d'autres grisâtres, certains toutefois conservent un aspect presque normal. En plus de ces modifications de coloration, les oeufs roses présentent une consistance plus faible.

Parmi les cas considérés, nous avons remarqué une ponte qui contenait à la fois des oeufs blanc nacré apparemment sains, des oeufs isolés à divers stades de rosissement, enfin des oeufs réunis en cordons à l'intérieur d'un manchon lui-même rosé.

HISTOLOGIE

Dans les pontes anormales, des oeufs de différentes teintes ont été prélevés et traités séparément pour être examinés en histologie. Des témoins pris dans les pontes normales ont subi les mêmes traitements. Tous les échantillons ont été fixés dans le Bouin et déshydratés dans l'alcool butylique. Les coupes de 5 µ d'épaisseur ont été colorées par l'hémalun-picro-indigo-carmin et par l'acide périodique Schiff.

L'examen au microscope photonique montre des éléments filamenteux, cloisonnés, ramifiés, de diamètre peu variable qui se colorent en rouge après avoir subi la coloration par l'acide périodique Schiff (fig. 3). Leur aspect morphologique et leurs réactions aux colorants sont caractéristiques de hyphes mycéliens. Dans la plupart des échantillons, ils sont répartis entre le chorion et le vitellus, dans quelques cas les ramifications mycéliennes pénètrent dans la zone centrale de l'oeuf. Nous n'avons pas observé de différences notables entre les oeufs présentant des teintes différentes.

L'examen histologique de la ponte comportant des oeufs groupés à l'intérieur d'un manchon montre la présence d'hyphes mycéliens dans différentes membranes anhistes recouvrant le vitellus.

ISOLEMENT ET ETUDE DU GERME

Dans le but de contrôler la nature de l'agent pathogène, des oeufs roses ont été désinfectés extérieurement par un trempage dans l'eau de javel 5 %, le chorion a été éliminé

et le contenu déposé sur le milieu gélosé de Sabouraud pour la mise en culture.

Dès le troisième jour, nous avons observé sur ce milieu le développement d'un champignon à la température du laboratoire (environ 20°C). Les colonies présentent un aspect cotonneux, blanches au début elles deviennent légèrement rosâtres après une dizaine de jours. Dans le milieu, le champignon libère un pigment violacé évoluant dans les cultures âgées vers une teinte brune. La couleur de ce pigment est voisine de celle que présentent les oeufs atteints.

L'examen microscopique de montages dans le bleu coton et le lactophénol d'une culture de 10 jours montre la présence de filaments mycéliens cloisonnés et de ramifications simples constituant des conidiophores et portant à leur extrémité des conidies. La majorité sont ovoïdes, souvent assez allongées et de petite taille. A côté de ces microconidies, on rencontre un faible pourcentage de macroconidies de grande taille en forme de croissant. Souvent bicellulaires mais parfois composées de 3 ou 4 cellules (fig. 4) dans les cultures âgées de trois semaines apparaissent de nombreuses chlamydospores à paroi épaisse correspondant à la transformation d'articles mycéliens en forme de résistance (fig. 5). Aucune reproduction sexuée n'a été constatée. Cet agent est donc un champignon imparfait du groupe des hyphomycètes. L'aspect des conidiophores et l'aspect caractéristique des macroconidies permettent de considérer qu'il s'agit d'un *Fusarium* sp. (Barnett, 1960 ; Clements et Shear, 1973), même s'il n'apparaît que très peu de conidiospores pluricellulaires, y compris lorsque l'on emploie des milieux de culture habituellement favorables à la sporulation des *Fusarium* tels que les milieux gélosés à base de pomme de terre et de carotte, de malt ou d'avoine.

ESSAIS D'INFECTION

Lors de l'observation de la ponte malade, nous avions noté qu'elle n'évoluait pas, les oeufs roses s'affaissent de plus en plus et ne conduisent à aucune éclosion.

Nous avons tenté des infections d'oeufs sains soit avec des fragments de manchon rosâtre contenant des oeufs, soit en les souillant avec une suspension contenant le mycélium obtenu en culture.

Lorsque la source de contamination est formée par un groupe d'oeufs atteints, un duvet mycélien superficiel se développe peu à peu et s'étend aux oeufs voisins. Cependant, même dans ce cas, comme après infection par la suspension, aucun oeuf ne se colore en rose et la plupart éclosent et donnent naissance à des jeunes présentant apparemment une vitalité normale.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Il apparaît que le syndrome léthal que nous décrivons se manifeste d'abord par l'existence de pontes dont la plupart des oeufs sont colorés en rose et n'évoluent pas vers

l'éclosion des jeunes. Etant donné les conditions d'isolement et d'étude, le champignon isolé peut être considéré comme l'agent pathogène responsable. Il s'agit d'un hyphomycète du genre *Fusarium*. Ces champignons sont généralement considérés comme pathogènes pour les plantes ou saprophytes. On sait cependant depuis quelques années qu'ils peuvent attaquer des invertébrés, en particulier des insectes (Hasan et Vago, 1972) et des crustacés (Vey et Vago, 1972 ; Lightner, 1975 ; Lightner et Fontaine, 1975).

Il est intéressant, de plus, de noter que parmi les données fragmentaires concernant les infections fongiques des gastéropodes, deux rapportent l'action de champignons sur les oeufs, le seul agent identifié étant un *Verticillium*, c'est-à-dire un hyphomycète taxonomiquement voisin de *Fusarium* (Gain, 1896 ; Tervet et Esslemont, 1938). En outre, Lovett et Black (1920) ont indiqué que des limaces étaient sensibles à un champignon sans apporter d'autres précisions. Il peut d'autre part être tenu comme probable que la contamination très précoce doit s'effectuer avant la ponte elle-même. En effet, l'infection des oeufs normaux n'a pu être réalisée expérimentalement et cette hypothèse peut être soutenue par la constatation faite par l'éleveur (*) ayant observé un escargot pondant des oeufs rosis. Pour appuyer encore cette interprétation, on peut rapprocher ce phénomène de l'ancienne observation de Laurent rapportée par Gain (1896) et mentionnant l'infection par un champignon des oeufs de la limace *Decoceras reticulatum* avant même leur déposition.

Il nous paraît utile de continuer cette recherche et d'entreprendre une étude détaillée du mode d'action et du site de multiplication de ce champignon chez l'escargot.

L'essor des élevages de ces gastéropodes terrestres rend nécessaire ce travail, d'autant plus que la production industrielle d'escargots comporte à la fois la ponte et l'élevage des animaux après la ponte. Ainsi, ces études seront poursuivies parallèlement sur le plan de la recherche pathologique et sur celui de la mise au point d'une méthode thérapeutique et prophylactique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARNETT H.L., 1960. - Illustrated genera of imperfect fungi, 2nd edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 225 pp.

CLEMENTS F.E., SHEAR C.L., 1973. - The genera of fungi. Hafner Publishing Company, New-York, 496 pp.

GAIN W.A., 1896. - Enemies of our land and fresh water molluscs. *Naturalist's Jour.* : 77-79.

HASAN S., VAGO C., 1972. - The pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to mosquito larvae. *J. Invert. Pathol.*, *20* : 268-271.

(*) Nous tenons à remercier MM. Auer et Kauffer (Société Gastropolis) qui nous ont adressé les pontes malades et nous ont fait part de leurs observations.

LIGHTNER D.V., 1975. - Some potentially serious disease problems in the culture of penaeid shrimp in North America. Proc. U.S. Japon Natural Ressources Program. Symposium on aquaculture diseases, Tokyo, Japan, 16-18 oct. 1974.

LIGHTNER D.V., FONTAINE C.T., 1975. - A mycosis of the american lobster *Homarus americanus* caused by a *Fusarium* sp. *J. Invert. Pathol.*, *25* : 239-245.

LOVETT A.L., BLACK A.B., 1920. - The gray garden slug with notes on allied forms. *Oregon Agric. Coll. Exp. Sta. Bull.*, *170* : 1-43.

TERVET I.W., ESSLEMONT J.M., 1938. - A fungous parasite of the eggs of the gray field slug. *Jour. Quekett Microscopical Club London*, 4e ser. *1* (1) : 1-3.

VEY A., VAGO C., 1972. - Recherches sur les maladies actuelles des écrevisses en France. *Ann. Hydrobiologie*, *3* : 59-64.

LEGENDE DES FIGURES

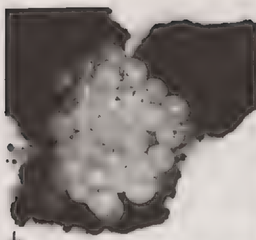
Fig. 1 - Ponte d'oeufs d'*Helix aspersa* normaux.

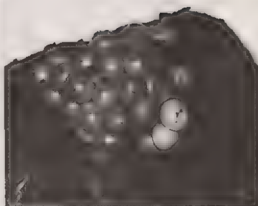
Fig. 2 -"Ponte rose" presque exclusivement constituée par des oeufs atteints par le champignon.

Fig. 3 - Vitellus d'oeufs d'*Helix aspersa* pénétré par le mycelium (my) de *Fusarium sp.* X 1000.

Fig. 4 - *Fusarium sp*, isolé à partir d'oeufs d'*Helix aspersa* et cultivé sur malt gélosé, microconidies (m) et macroconidie (M) quadricellulaire arquée aux extrémités pointues caractéristique du genre. X 450.

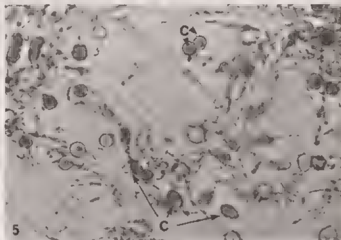
Fig. 5 - Nombreuses chlamydiospores développées dans une culture âgée de *Fusarium sp.* X 450.


1


2


MY
MY


m
M
4


C
C
5

Haliotis, 8, 1977 (1979)
p. 271 à 277

RECENTS PROGRES EN PATHOLOGIE DES MOLLUSQUES MARINS

par J.R. Bonami[(x)]

RESUME

Le développement récent, très important depuis une dizaine d'années, de la pathologie des mollusques marins se traduit par la découverte d'agents pathogènes nouveaux, notamment de virus, de rickettsies et de protistes et par l'orientation des recherches vers la pathologie expérimentale.

Ces résultats sont analysés et leur signification pour la pathologie comparée et pour le développement de la maréculture est discutée.

RECENT PROGRESS IN PATHOLOGY OF MARINE MOLLUSCS

SUMMARY

Progress in pathology of marine molluscs has been considerable for these last ten years and bears on the discovery of new pathogens, particularly viruses, rickettsias, protozoa, and on the orientation of research works to experimental pathology.

Results of these works are analyzed and their significance for comparative pathology and mareculture is discussed.

Le domaine particulier de la pathologie des invertébrés que constitue la pathologie des mollusques marins, a actuellement un développement important, d'une part à la suite de la récente découverte de nouveaux germes pathogènes pour les mollusques marins, d'autre part à cause de la poursuite de travaux apportant des explications étiologiques à des états pathologiques jusqu'alors mal définis.

Pendant longtemps limité à des observations de parasitoses et de protozonoses ce secteur est marqué par la récente description d'affection dûe à des germes de type viral, rickettsien et mycoplasmique dont certaines constituent de graves épizooties. Ainsi actuellement, des virus sont dénombrés chez les huitres *Crassostrea angulata, C. gigas, C. virginica,* chez *Tellina tenuis* et chez deux Céphalopodes, *Sepia officinalis* et *Octopus vulgaris.* Des micro-organismes de type rickettsien ,chlamydien et mycoplasmique ont été notés chez les huitres *C. gigas, C. virginica* et chez les coquillages *Mercenaria mercenaria* et *Mya arenaria.*

(x) Laboratoire de Pathologie Comparée,
Université des Sciences, CNRS-INRA et EPHE, 34060 Montpellier (France)

Enfin de par sa structure inhabituelle, sa position taxonomique incertaine, et l'importance qu'on lui attribue en tant que responsable de l'épizootie européenne actuelle de l'huitre plate, *Ostrea edulis*, un protiste *Marteilia refringens* fait l'objet de plusieurs travaux.

A. MALADIES VIRALES

Ce sont Devauchelle et Vago (1971) qui découvrent les premiers la présence de particules d'allure virale chez les Mollusques marins. A la suite d'investigations sur l'estomac de la seiche *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode), ils décrivent des particules parasphériques, sans enveloppe, de 75 nm de diamètre, dont le centre est occupé par une zone dense aux électrons, souvent groupées en plages cytoplasmiques paracristallines. Leur mode de formation à la périphérie d'une zone cytoplasmique dense aux électrons, leur taille, leur structure, et leur libération par lyse cellulaire, les rapprochent des virus à ARN du type Reovirus.

Peu après, Rungger et al. (1971) observent des particules d'allure virale, de 100 à 140 nm de diamètre, associées à des lésions d'allure tumorale au niveau des muscles de *O. vulgaris*.

Au cours d'une étude sur la survie et la croissance d'huitres *C. virginica*, maintenues dans des eaux à température élevée, et provenant de la région du Maine (USA) une certaine mortalité est notée (Farley, 1972), associées à la présence, en histologie, de corps d'inclusion intranucléaires. Au sein de ces inclusions se remarquent des particules d'allure virale de 70 à 90 nm de diamètre, enveloppées, de contour hexagonal à nucleoïde plus dense. L'auteur les rapproche des Herpès virus, mais aucune transmission expérimentale n'a été réalisée et le virus n'a pas été isolé.

Ce même auteur (Farley, 1976) note la présence de particules d'allure virale dans le noyau de cellules hypertrophiées de l'ovaire de l'huitre *C. virginica*. Ces particules, de 53 nm de diamètre, non enveloppées ont été rapprochées par l'auteur du groupe des Papovavirus.

Une découverte d'une signification économique exceptionnelle est relative à la grande épizootie et aux mortalités massives de 1970-1973 de l'huitre portugaise *Crassostrea angulata*, qui ont conduit à la disparition de cette espèce des côtes françaises et dont les causes étaient jusqu'à présent inconnues. Des recherches étiologiques approfondies ont eu lieu récemment (Comps et al. 1976) et ont abouti à la mise en évidence d'une infection virale en relation avec cette épizootie. En microscopie électronique on

observe des particules à section hexagonale localisées dans le cytoplasme de cellules atypiques à aspect de leucocytes. De 350 nm de diamètre environ, ces particules sont formées d'une masse centrale dense aux électrons de 190 nm de diamètre et limitées par un système membranaire de 30 nm d'épaisseur. La morphogénèse s'effectue à partir d'un viroplasme dense aux électrons, à la périphérie duquel se différencient des membranes qui entourent une portion du matériel dense, puis s'en détachent. Ce virus, possèdant une taille exceptionnellement grande dépassant largement celle des plus gros virus à capside de symétrie cubique connus, est rapproché par les auteurs, de par sa forme et la similitude de la morphogénèse virale cytoplasmique, du groupe des Iridovirus.

La mise en évidence de cette virose revêt une importance particulière. En dehors du fait qu'il s'agisse, à l'échelle de la virologie générale, d'un virus de type nouveau, c'est la première mise en évidence d'une virose en relation avec une épizootie d'huitres.

Ces résultats ont conduit Comps et Duthoit (1976) à reprendre l'étude en microscopie électronique, d'une maladie des huitres portugaises qui avait précédé les mortalités massives de 1970-1973 ; la "maladie des branchies", jusqu'alors attribuée à un protiste *Thanatostrea polymorpha* (Arvy et Franc, 1968 ; Franc et Arvy, 1969). Ces travaux ont conduit à la mise en évidence de particules virales à différents stades de leur virogénèse dans le cytoplasme de cellules volumineuses situées au niveau des lésions branchiales et des palpes. Ce virus présente une morphologie, une taille et un développement comparables à celui décrit dans le cas de l'épizootie virale de 1970-1973 et qui vient d'être mentionné.

L'ensemble de ces résultats devient de grande actualité à la lumière de l'observation récente (Comps et Bonami, 1977) d'un virus semblable associé à des mortalités chez l'huitre *C. gigas* des côtes atlantiques françaises. En effet il s'agit de l'espèce introduite en Eurpoe pour remplacer ces populations de *C. angulata*. Ainsi la découverte de ce type de virus chez l'huitre acclimatée conduit à reconsidérer certains aspects de la résistance attribuée à cette espèce.

A la suite de l'observation de Buchanan (1973) de particules d'allure virale de 70 nm de diamètre environ, dans le cytoplasme de cellules sécrétrices de la glande digestive de *Tellina tenuis*, Hill (1976a) isole un virus sur la lignée cellulaire de poisson BF2 et détermine un certain nombre de ses propriétés *in vitro*. Mais le virus isolé n'est pas celui décrit par Buchanan (Hill, 1976b), les inclusions observées dans les cellules sécrétrices étant formées de micro-organismes de type rickettsien, infectés par un phage.

Utilisant la même technique, Hill (1976b) isole 12 souches virales à partir d'extraits de glandes digestives de divers mollusques marins inoculés à des cellules BF2 en culture. Ces virus, (Underwood et al. 1977) parasphériques non enveloppés ont un diamètre moyen de 59 nm et un coefficient de sédimentation de 430 S. Ils renferment un ARN vraisemblablement bicatenaire de 2,8 x 10^{6} daltons. La capside est formée de trois polypeptides ayant un poids moléculaire respectif de 110, 67 et 40 x 10^{3} daltons. Les auteurs indiquent en dehors de la ressemblance et de propriétés semblables, une faible communauté antigénique avec différents sérotypes du virus de la nécrose pancréatique (IPN) des poissons. La question de la provenance et le rôle de ces particules reste ainsi posée.

B. INFECTIONS A RICKETTSIES

Des inclusions cytoplasmiques, finement granuleuses et basophiles ont été observées (Harshbarger et al., 1976) dans les cellules des tubules digestifs de *Mercenaria mercenaria*. Elles constituent différents stades d'un procaryote rapproché par les auteurs aux chlamydies. Les formes denses mesurent 200 à 300 nm et les formes larges de 400 à 900 nm, et dont certaines contiennent des particules d'allure phagique de 50 nm de diamètre, rangées en plages.

Chez *Mya arenaria* ce même travail signale un micro-organisme de type rickettsien de 300 nm de diamètre sur 2500 nm de long et chez *Crassostrea virginica*, des éléments rappelant la structure des mycoplasmes de 250 à 350 nm de diamètre sur 400 à 1000 nm de long.

De leur côté Comps et al. (1977), décrivent chez l'huitre du pacifique *Crassostrea gigas* des côtes françaises, un micro-organisme de type rickettsien de 500 à 600 nm de diamètre sur 1500 à 2500 nm de long. Ce germe est de localisation cytoplasmiques.

Ces observations présentent un intérêt de par leur nouveauté sur le plan de la rickettsiologie comparée et aussi du fait que dans le groupe encore peu exploré des rickettsies existent des agents d'affections humaines et animales mais dont les modalités de circulation ou les cycles écologiques ne sont que très partiellement connus.

C. INFECTIONS A PROTISTES

Une maladie de l'huitre plate *Ostrea edulis*, par l'impact économique dû à ses conséquences et par son actualité préoccupe plusieurs auteurs et laboratoires. Les observations de Comps (1970) sur des mortalités d'huitres plates de la région de Marennes, et de Herrbach (1971) sur des cas de mortalité sévissant depuis 1968 dans les abers Wrach et Benoît,mettaient en évidence l'existence d'un parasite nouveau de l'huitre, localisé au niveau de l'épithelium stomacal et des diverticules digestifs.

L'étude du parasite en microscopie électronique (Bonami et al., 1971, Grizel et al., 1974a ; Grizel et al. 1974b) permettait d'en décrire le cycle dans l'huitre, mais aussi de donner une description détaillée de chacun des stades. A son stade le plus évolué, le parasite est formé d'une cellule primaire, renfermant des cellules secondaires, qui contiennent elles-même quatre cellules tertiaires.

Dès les premières observations en microscopie électronique (Bonami et al. 1971), la présence de particules denses aux électrons, de 230 nm de long sur 140 nm de large, étaient notées aussi bien au sein des cellules primaires que tertiaires. Ces particules, de forme ovoïde et de section circulaire ou hexagonale comportent une zone corticale de 22-23 nm formée de quatre feuillets denses aux électrons (dont deux accolés) séparés par deux espaces clairs, et une partie medullaire dense à sa périphérie. L'étude comparée de ces particules d'allure virale en ce qui concerne leur structure, (Grizel et al. 1974a) présentes dans les cellules tertiaires et dans le cytoplasme de la cellule primaire, permet d'envisager l'hypothèse d'une formation au sein de la cellule primaire et d'une migration vers les cellules tertiaires. En effet, le cytoplasme de la cellule primaire contient des formations vacuolaires limitées par une membrane unitaire et contenant des structures membranaires vésiculaires. Ces vésicules, limitées par une membrane unitaire, s'accolent à la membrane vacuolaire et se densifient progressivement. Ces particules ainsi formées, sont libérées dans le cytoplasme de la cellules primaire par bourgeonnement. Leur apparition plus tardive au niveau des cellules tertiaires conduit à penser qu'il puisse se produire une migration à partir de la cellule primaire.

Malgré les nombreux travaux engagés sur ce sujet, la structure peu commune de ce parasite, les lacunes dans l'établissement de son cycle et la méconnaissance du mode d'infestation rendent présentement impossible le rattachement sûr à un groupe connu. Tour à tour rapproché des *Chytridiales* (Herrbach, 1971), du genre *Labyrinthomyxa* (Grizel et Tige, 1973) et des Haplosporidies (Comps, 1970 ; Perkins, 1976), ce parasite pose toujours le problème de sa nature réelle en plus de ceux dûs à son pouvoir épizootique élevé.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus depuis une dizaine d'années sont en pathologie des mollusques des témoins d'un développement récent très important de cette discipline de la biologie marine. Il est à souligner que parmi les nombreux pathogènes décrits, nouveaux pour les Mollusques, les virus et les rickettsies apparaissent la première fois ouvrant des orientations entièrement nouvelles.

Cette évolution a récemment tout naturellement entrainé la recherche vers la pathologie expérimentale, mettant en oeuvre des principes d'approche ultrastructuraux, biochimiques et immunologiques, aspects peu exploités par le passé. On doit souligner l'utilisation de la culture *in vitro* de cellules de mollusques, technique ayant récemment déjà permis dans certaines études virologiques des progrés décisifs.

Ainsi la pathologie des mollusques marins semble pouvoir présenter sous peu le même profil d'étendue de domaines et de méthodes d'approche que les secteurs les plus développés de la pathologie des Invertébrés. L'importance économique de plus en plus accrue de la maréculture constitue à cet égard un élément décisif.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARVY L. et FRANC A., 1968 - Sur un protiste nouveau, agent de la destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. *C.R. Acad. Sci. Paris, 267*, 103-105.

BONAMI J.R. GRIZEL H. VAGO C. et DUTHOIT J.L., 1971 - Recherches sur une maladie épizootique de l'huitre plate *Ostrea edulis* Linné. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35*, 415-418.

BUCHANAN J..S., 1973 - Electron microscopic observations of virus-like particles in the digestive gland of a marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). VI th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p. 28.

COMPS M., 1970 - Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates *Ostrea edulis* L. dans le bassin de Marennes. *Cons. Inter. Exploi. Mer. C.M., K, 4.*

COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et CAMPILLO A., 1976 - Une virose de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk). *C.R. Acad. Sci. Paris, 282*, 1991-1993.

COMPS M. et BONAMI J.R., 1977 - Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. *C.R. Acad. Sci. Paris, 285*, 1139-1140.

COMPS M., BONAMI, J.R., VAGO C., 1977 - Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez l'huître *Crassostrea gigas* Thumberg. *C.R. Acad. Sci. Paris, 285*, 427-429.

COMPS M., DUTHOIT J.L., 1976 - Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C.R. Acad. Sci. Paris, 283*, 1595-1596.

DEVAUCHELLE G. et VAGO C., 1971 - Particules d'allure virale dans les cellules de l'estomac de la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusques, Cephalopodes). *C.R. Acad. Sci. Paris, 272*, 894-896.

FARLEY C.A., 1976 - Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve Mollusks. *Prog. exp. Tumor Res., 20,* 283-294.

FARLEY C.A., BANFIELD W.G., KASNIC G. and FOSTER W.S., 1972 - Oyster herpes-type virus . *Science, 178,* 759-760.

FRANC, A., ARVY L., 1969 - Sur *Thanatostrea polymorpha* n.g., n. sp., agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. *C.R. Acad. Sci. Paris, 268,* 3189-3198.

GRIZEL H., COMPS M., COUSSERANS F., BONAMI J.R. et VAGO C., 1974a - Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Sci. Paris, 279,* 783-784.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. et LE PENNEC M.A., 1974b - Recherche sur l'agent causal de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.,* 240-241.

GRIZEL H. et TIGE G., 1973 - La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis* Linné. *Cons. Int. Exploi. Mer, Com Crustacés, Coquillages et Benthos, C.M./K,* p. 13.

HARSHBARGER J.C., SING CHEN CHANG and OTTO, S.V. 1977 - Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. *Science, 196,* 666-668.

HERRBACH B., 1971 - Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35,* 79-87.

HILL B.J., 1976a - Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (da Costa). *Wildlife Diseases (ed. by L.A. Page),* pp. 445-452. Plenum Press, New-York.

HILL B.J., 1976b - Molluscan viruses : their occurence, culture and relationships. Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology, Kigston, Ontario, pp. 25-29.

PERKINS F.O., 1976 - Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens,* Taxonomic implication. *J. Protozool., 23,* 64-74.

RUNGGER D., RASTELLI M., BRAENDLE E. and MALSBERGER R.G., 1971 - A virus like particle associated with lesions in the muscles of *Octopus vulgaris. J. Invert. Pathol., 17,* 72-80.

UNDERWOOD B.O., SMALE C.J., BROWN F. and HILL B.J., 1977 - Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. gen. Virol., 36,* 93-109.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 279 à 283

THE BIOLOGICAL CONTROL OF VECTORS FOR THE WORLD HEALTH ORGANIZATION SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES

by John D. Briggs (*) and Andrew A. Arata (* *)

SUMMARY

The Special Programme is concerned with malaria, filariasis, schistosomiasis, leishmaniasis, trypanosomiasis, (both African and American) and leprosy. Emphases in each disease are to obtain vaccines, develop new diagnostic tests and drugs, and the improvement in the control of vectors. The use of biological control agents is a principal priority. The detection, isolation and practical development of natural enemies of snails, particularly microbiological agents which can be mass produced for field use, must receive immediate attention. A 5-stage plan bas been implemented in 1976 for the review of efficacy and safety of biological agents. The identification of a network of World Health Organization (WHO) Collaborating Centres and laboratories has been initiated, and research is to be stimulated through partial support of investigations with Special Programme funding. Access to field sites is possible through the WHO for investigation and testing of biological agents for interruption of schistosomiasis. Opportunities should be available to participate in the continuing professional development of scientists, and training of support personnel in nations affected by the specified tropical diseases.

LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES VECTEURS DANS LE PROGRAMME SPECIAL DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE SUR LA RECHERCHE ET L'APPLICATION CONCERNANT LES MALADIES TROPICALES.

RESUME

Le programme spécial concerne le paludisme, le filariose, la schistosomose, la leishmaniose, le trypanosomiase (africaine et américaine) et la lèpre. Les objectifs pour chaque maladie sont l'obtention de vaccins, le développement de nouveaux tests de diagnostic et de remèdes et le progrès dans la lutte contre les vecteurs. L'utilisation des agents de lutte biologique est une priorité. La détection, l'isolement et l'exploitation des ennemies naturelles de gastéropodes, en particulier des agents microbiens, doivent recevoir une attention immédiate. Un programme de cinq étapes a été élaboré en 1976 en vue de l'étude de l'efficacité et l'innocuité des agents biologiques. Un réseau OMS de Centres associés et de laboratoires se structure et des recherches sont soutenues par le financement partiel des investigations grace aux crédits du programme spécial. L'OMS facilite l'accés des sites pour l'étude et les tests d'agents biologiques en vue de la lutte contre la schistosomiase. Le perfectionnement permanent de chercheurs est favorisé ainsi que la formation du personnel dans des pays touchés par les maladies tropicales mentionnées.

(*) The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA
(* *) Vector Genetics and Bionomics, World Health Organization, Geneva, Switzerland

The World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases has two principal objectives with equal emphasis:

- Research and development of improved tools needed to control tropical diseases ;
- Training and strengthening of biological research capability in tropical countries.

The result of the Special Programme should be the self-sufficiency of developing countries to provide leadership in the reduction of the effects of the diseases on their nations. The success of the entire Special Programme will be judged on how much benefit results, and remains to develop from the second objective. Consequently, the continuing professional development or resident scientists and training of support personnel is an essential element in research activities in areas of endemic tropical diseases.

The six diseases which will receive attention are :

- Malaria
- Schistosomiasis
- Filariasis (including Onchocerciasis)
- Trypanosomiasis (African and the Chagas' Disease in the Americas)
- Leishmaniasis
- Leprosy

but only leprosy does not have an invertebrate as a vector or an intermediate host.

For the six diseases three lines of research will be pursued for disease control :

- improvement in diagnostic techniques
- the development of new drugs for therapy and the improvement of existing drugs, and
- emphasis on vaccine development.

For those diseases with an invertebrate vector, emphasis will be on biological control of vectors as part of an integration of methods to interrupt the transmission of the five diseases.

The plan of the Special Programme is to provide educational opportunities by the increase in strength of institutions in nations or regions affected by the diseases. This plan assumes participation of individuals and institutions from developed countries in cooperation with specific individuals in developing countries to conduct carefully planned activities which are financially sppported by contracts in the Special Programme.

The proposals for financial support of research and educational activities can originate with individuals in any country. The proposals can include both research and training or institutional strengthening activities. The agreement of individuals or consortia of individuals or institutions in a host country is essential. Proposals can include the development and conduct of workshops or formal curricula development centered in a developing country, or the exchange of scientists for short periods of time to gain skills and experience relevant to research on a tropical disease.

The research is expected to be strictly goal orientated in two 5-year periods beginning in 1977 and 1982. The goals for each of the research interests in drug therapy, diagnostic techniques, vaccine development and vector control will be established by the scientific and academic community internationally through individual Scientific working Groups (SWG) for :

(a) each of the parasitic diseases

(b) epidemiology

(c) the biological control of vectors, and

(d) institutional strengthening and research capability.

Scientific Working Groups have continuity in time, however, membership can change partially from one meeting to the next. The SWGs have the responsibility to plan research with long range objectives and short term goals. These will include suggestions as to who should conduct the research, how long it should take, and how much it should cost. Requests for proposals for contract research to satisfy specific goals will be circulated in the scientific community, or unsolicited research applications from individuals can be reviewed for support. A steering Committee of the SWG is responsible for final recommendations on research plans and funding of the appmications and the research plans.

In 1977 the SWGs have met for the six diseases, and Epidemiology, and for Biological Control of Vectors. The SWG for Institutional Strengthening and Research Capabilities will meet in the last quarter of 1977. The Biological Control SWG was addressed by the representatives of the SWG for each of the 5 vector borne diseases. With respect to biological control activities, the policy in the WHO is to have a candidate biological agent reviewed in a 5-stage scheme. The details of the scheme are given in Table One.

The principal new element for biological control in this scheme is the testing for safety of humans and other non-target organisms in Stages II and IV. For mosquitos and blackflies, 4 biological agents have been reviewed into Stage IV : a microsporida protozoa, a fungus (*Metarrhizium anisopliae*) and *Bacillus sphaericus*.

TABLE ONE

SCHEME FOR SCREENING AND EVALUATING THE EFFICACY, SAFETY, AND ENVIRONMENTAL IMPACT OF BIOLOGICAL AGENTS FOR CONTROL OF DISEASE VECTORS

STAGE I	STAGE II		STAGE III	STAGE IV		STAGE V
Laboratory	Laboratory	RESULTS OF REVIEW OF STAGES I & III	Preliminary field trials	Laboratory	REVIEW OF STAGES I,II,III and IV BY INFORMAL CONSULTATION GROUP	Large scale field trials
A. Identification and characterization.	A. Mammalian infectivity tests to ensure safety to laboratory and field personnel		A. Strictly regulated tests under WHO supervision to determine efficacy against disease vectors under natural conditions	A. Detailed tests on mammalian infectivity.		To be conducted under WHO auspices. Not presently defined, and will vary according to target vector, habitat (s) mode of application
B. Assessment against selected target vectors.	B. Preliminary assessment against certain non-target species.		B. With the use of larger amounts of biological control agents methods of application should begin to receive attention	B. Detailed laboratory and field studies on the non-target range, especially other fauna in representative habitats where Stage V trials may be conducted		
C. Preliminary evaluation of ease of rearing in quantity				C. Studies on stability of suitable formulations, and delivery systems.		

The detection, isolation and development of biological control agents for vectors including snails is facilitated by the activities of a growing network of collaborating laboratories and centers which were initiated in 1964. The WHO vector biology and control network included invertebrate zoologists and microbiologists to provide services to the biologist requiring assistance in identification or histology of specimens, or wishes to provide leadership in the development of a biological agent. Collection materials for snail specimens to be posted to a collaborating center may be obtained for use at no cost. In the research plans for biological control, the emphasis is on the microorganisms which affect vectors. However, attention will be given to all biological agents and evidence supporting the adjustment of goals in the research plan for the biological control of snails which serve as intermediate hosts in schistosomiasis. Further a malacologist in the Vector Biology and Control Division of WHO in Geneva can advise on the procedures for development of a biological agent and the selection of field sites for Stage III and I tests for an agent in the 5-stage scheme.

Two pertinent references are the detailed description of the role of microbiological agents in vector control (Arata, 1977) and an annotated bibliography of microorganisms which cause pathologies in arthropods (Roberts and Strand, 1977).

For specific information on the plans of research developed by the SWGs for Schistosomiasis, and for Biological Control of Vectors, and the opportunity for research support, please address enquiries to : "The Secretary, Scientific Working Group for Schistosomiasis", or (for Biological Control of Vectors) : Special Programme, World Health Organization, 1121 Geneva 27, Switzerland.

REFERENCES

ARATA A.A., 1977 - The developing role of microbiological agents in Vector control. *Experientia*, *33*, 125-130.

ROBERTS D.W. and STRAND, M.A., 1977 - Pathogens of medically important Arthropods. *Bulletin of the world Health Organization*, *55*, Supplement N°1, pp 419.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 285 à 295

STATUS OF SELECTED UNICELLULAR EUCARYOTE PATHOGENS, AND PREVALENCE AND HISTOPATHOLOGY OF INCLUSIONS CONTAINING OBLIGATE PROCARYOTE PARASITES, IN COMMERCIAL BIVALVE MOLLUSKS FROM MARYLAND ESTUARIES

by Sara V. Otto (*), John C. Harshbarger and Sing Chen Chang (**)

SUMMARY

Recent surveys of American oysters, *Crassostrea virginica*, hard clams, *Mercenaria mercenaria*, and soft-shell clams, *Mya arenaria*, from the Chesapeake and Chincoteague Bays show light infections of gregarines such as *Nematopsis ostrearum* and ciliated thigmotrichs such as *Ancistrocoma pelseneeri* and *Sphenophrya* sp. Prevalences of *Minchinia nelsoni* (etiological agent for "MSX" disease) has disappeared from all but one site where the histological appearance of the host-parasite relationship suggests that the oyster has developed a resistance to the parasite. *Dermocystidium marinum* has declined in virulence as well as dropped to its lowest prevalence levels (0-18%) in years. Procaryote parasites chlamydia (some with phages), rickettsia and mycoplasma-like organisms (Harshbarger et al., 1977), which were predominately seen as various types of cytoplasmic inclusions educing no host defense response, had an average prevalence of 12.3 % in *M. mercenaria*, 20.2 % in *M. arenaria* and 5.6 % in *C. virginica*.

POSITION DE CERTAINS EUCARYOTES UNICELLULAIRES PATHOGENES ET HISTOPATHOLOGIE DES INCLUSIONS RENFERMANT DES PROCARYOTES PARASITES OBLIGATOIRES CHEZ DES MOLLUSQUES BIVALVES D'INTERET COMMERCIAL DES ESTUAIRES DE MARYLAND

Des échantillonnages récents de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, de coquillages *Mercenaria mercenaria* et *Mya arenaria* des baies de Chesapeake et Chincoteague montrent de faibles infections à grégarines (*Nematopsis ostrearum*) et à thigmotriches ciliés (*Ancistrocoma pelseneeri* et *Sphenophyra* sp.). L'invasion à *Minchinia nelsoni* (agent de la maladie MSX) a disparue de tous les sites excepté un ou l'image histologique du rapport hôte-parasite suggère que l'huître aquis une résistence vis à vis du parasite. Sa virulence de *Dermocystidium marinum* a diminué et a atteint son taux le plus bas (0-18 %) depuis des années. Des procaryotes parasites (chlamydies, certaines avec phages, rickettsies et microorganismes ressemblant aux mycoplasmes) (Harshbarger et al., 1977) sous forme de différents types d'inclusions cytoplasmiques sans réactions de l'hôte, sont présents au taux de 12,3 % chez *M. mercenaria*, à 20,2 % chez *M. arenaria* et à 5,6 % chez *C. virginica*.

(*) Maryland Department of Natural Resources, Fisheries Administration, State Laboratory, Oxford, Maryland, 21654, U.S.A.

(**) Registry of Tumors in Lower Animals, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D.C. 20560, U.S.A.

We thank J. Hammed and L. Cullen for technical assistance, and P. Schellenger for clerical and editorial assistance. Supported in part by U.S. Department of Commerce contract NOAA 76051402, State of Maryland Fisheries Administration project 3-188-R, NIH contract N01-CB-33874, and FDA contract 223-74-2129.

INTRODUCTION

In 1967 the Maryland Fisheries Administration began investigating parasite-host relationships and other pathological conditions detrimental to three commercially important mollusks, the American oyster, *Crassostrea virginica*, the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, and the soft-shell clam, *Mya arenaria*. All the animals were from the Maryland portion of the Chesapeake Bay, except that approximately one-half the *M. mercenaria* were from Chincoteague Bay. During the surveys, a significant prevalence of cytoplasmic inclusions was observed in all three species and in 1974 a collaborative project was initiated with the co-authors to examine electron microscopically these inclusions as well as tissues from several specimens with neoplasms.

MATERIALS AND METHODS

M. mercenaria were collected monthly from June 1970 - April 1973 from the Pocomoke Sound and Tangier Sound in Chesapeake Bay and from near the Maryland/Virginia border in Chincoteague Bay (Fig. 1). *M. arenaria* were collected sporadically from five areas in the Maryland portion of the Chesapeake Bay (Fig.1). *C. virginica* were collected from 23 areas of the Bay (Fig. 1).

After receipt at the laboratory, shellfish were coded, scrubbed, measured, opened and examined macroscopically. A transverse section of tissue about 10 mm thick from each animal, was fixed in Davidson's, dehydrated, embedded in paraffin, sectioned at 6 um, strained with Harris' hematoxylin and eosin (Farley, 1965a) and examined microscopically (Farley, 1967, 1968). Occasionally, a Feulgen-picro-methyl blue method (Farley, 1969) was used to accent nuclear detail and/or a periodic acid-Schiff (PAS) method was used to demonstrate glycogen.

EUCARYOTE PATHOGENS

During the period from 1963-1967, the haplosporidan parasite of oysters, *Minchinia nelsoni*, had been identified as the causative agent of "MSX" disease, a severe epizootic in all of Chesapeake Bay with mortalities estimated as high as 90 % in some areas (Haskin, 1961, 1962 ; Mackin, 1961 ; Farley, 1965b, 1967 ; Haskin et al., 1965 ; Couch et al., 1966). In 1967, mortality and prevalence levels began to decline rapidly, and by 1970 the parasite had nearly disappeared from the Maryland portion of Chesapeake Bay. Currently, *M. nelsoni* is only found in a small area of Tangier Sound where the microscopic appearance of the infection (moribund plasmodia, less intense infection levels, and the robust host response) suggests the development of a resistance by the oyster.

The commensal gragarine, *Nematopsis ostrearum*, usually found in the spore stage in oyster mantle and visceral connective tissue is regarded as a sensitive "indicator" organism. For example, it was always found in the middle to southern areas of the Bay, but recently infections have been found in oysters in the northern-most sample area. Chester River. This could indicate a subtle change in Bay environments or could be the result of transplanting lower Bay oysters to this up per area.

The ciliated thigmotrich, *Ancistrocoma pelseneeri*, is a commensal or a secondary invader in oysters and soft-shell clams. It is usually found in the lumen of the digestive system of weak or diseased animals where it causes little pathology. A ciliated thigmotrich, resembling *Sphenophrya* species discussed by Chatton and Lwoff (1950), is found attached to gill epithelial cells in 4-5 % of upper Bay oysters. All stages are seen, ranging from the ciliated larva to the non-ciliated adult. We discovered that this commensal occasionally induced a very distinctive display known as a xenoma (Weissenberg, 1922, 1949) in which one of the organisms enters a host cell and promiferates. Concurrently, the host cell undergoes repeated karyokinesis and hypertrophies to an enormous size to accommodate the hundreds of ciliates contained therein. The xenomas range from a normal sized cell containing a single organism to a macroscopic, palpable cell about 3 mm long. Neither the organism nor the xenoma seem to distress the oyster, but theoretically, high numbers of ciliates on the gill filaments could interfere with respiration and feeding. Xenomas occurred in less than 1 % of these *Sphenophrya*-infected oysters ; xenomas have not previously been reported in mollusks.

The serious oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*, (also known as *Labyrinthomyxa marina*) which was long accepted as a fungus on the basis of its positive PAS reaction, may be a coccidium based on recent studies of its fine structure (PERKINS, personal communication). Most infective in dense populations at moderate salinities below 25°C, it is directly transmitted, penetrates through the gut and mantle, and pervades the entire host causing multiple abscesses, emaciation, germinal arrest, and death. Following the severe outbreak of *M. nelsoni* in the mid 1960's, oyster populations were drastically reduced in southern Maryland Chesapeake Bay and *D. marinum* all but disappeared. The oysters were replenished and in 1974 *D. marinum* became epizootic again with infection prevalence up to 100 ‰. However, the epizootic was not accompanied by the high mortalities previously seen subsequent to high infection prevalences. It is not known if this decreased severity was due to a less virulent strain, a greater resistance in the oysters, or outside factors. Data from the epizootic areas for 1977 show a prevalence of only 0-18 ‰. This sharp drop may be attributable to the 1976 - 1977 winter

being one of the coldest on record. To prevent disturbing the favorable conditions that now prevail and to give continuing studies the best chance to identify the relevant parameters, a strong recommendation has been made against transplanting to and from the shellfish beds in these areas (Otto and Krantz, in press).

In addition to 20,000 oysters, we have, to date, histologically examined 1,400 hard clams (*M. mercenaria*) and 2,400 soft-shell clams (*M. arenaria*). Generally, these two clam species are free of major parasites or pathogens. The only commensals found in them with any regularity are the ciliates, *A. pelseneeri*, and occasionally, *Sphenophrya* sp. No *Sphenophrya* xenomas have been seen. Although *D. marinum*-like organisms are known to infect *Mya*, they have not been found in our samples.

PROCARYOTE INCLUSIONS

Histopathology : Amorphous, basophilic inclusions (ABI's) were present in all three species of bivalves. They were intracytoplasmic, had a finely granular texture, were Feulgen positive, PAS negative, and evoked no abvious host defense response. There were two types of cytoplasmic inclusions in *M. mercenaria* : the most common type (which contained chlamydia, Harshbarger et al., 1977) occurred in epithelial cells of the digestive diverticulum (Fig. 2). These ranged from being barely detectable to huge irregular bodies up to 100 um in greatest diameter which had stretched the host cell nearly five times its normal width or 22 um and had pressed the nuclei and normal cytoplasmic organelles against the plasma membrane. There was no apparent limiting membrane other than the cell wall. The even granular texture was apparent but individual chlamydia could not be resolved with the light microscope except occasionally when they contained phages (Fig. 3). Rarely was more than one of these inclusions seen in a given tubule at the level of the section. The less common type of inclusion in the hard clam (which appears, by preliminary electron microscopy, to contain rickettsiae-like organisms) occurred in connective tissue cells. These were most frequently seen in but were not restricted to the gills (Fig. 4), had a more consistently round shape, a limiting membrane and ranged up to 75 um in diameter.

Rickettsiae-containing inclusions in *M. arenaria* (Harshbarger et al., 1977) were roundish, up to 100 um in diameter, and usually located singly in the epithelial cell cytoplasm but occasionally in the lumens of digestive diverticula (Fig. 5). In addition to their smaller, more regular shape, they also differed subtly from the chlamydial inclusions in the digestive diverticula of hard clams by being slightly less basophilic and by responding slightly less to the Feulgen reaction.

Two types of inclusions were seen in *C. virginica*. One type resembled the *M. arenaria* inclusions in size, shape, and granular appearance and was similarly located in the digestive diverticula. In contrast, however, numerous inclusions might be found clustered in the epithelial cells and lumen of an individual diverticulum at the plane of the section (Fig. 6). The second type of oyster inclusion (which was reported to contain mycoplasma-like organisms, Harshbarger et al., 1977), was located in gut goblet cells (Fig. 7). These were roundish, eccentrically situated, and approximately 50 μm in diameter.

Prevalence : Thirty-two hard clam samples of about 25 animals each, collected approximately monthly between June 1970 and April 1973 from Chincoteague Bay, had an ABI prevalence of 14.3 % (103/721). Twenty-eight monthly samples collected during approximately the same period in lower, mid Chesapeake Bay had an ABI prevalence of 10 % (69/690). The combined prevalence in the two areas was 12.3 % (173/1,411). There appeared to be no significant yearly, monthly, or geographical differences.

Soft-shell clams, collected from five areas of Chesapeake Bay over a seven year period, had a pooled prevalence of 20.2 % (482/2,401). Sampling was intermittent, regarding both time and location so no effort was made to test either of these parameters for significance.

Oysters were collected from a varying number of areas in the Chesapeake Bay from 1963-1973. In all, oysters were examined from 23 major areas and ABI's were found at all locations. Pooled mean prevalence for all sites and all times was 5.6 % (1,089/19,480). As with the other two species, there were no significant yearly, monthly, or geographical differences.

DISCUSSION

A total of five different types of inclusions containing microcolonies of chlamydia, rickettsia, and mycoplasma-like procaryotes were seen in three species of bivalves from the Maryland portion of Chesapeake and Chincoteague Bays. Their presence did not seem to be related to levels of salinity, water temperature, industrial or domestic sewage. Hard clams from Chincoteague Bay, which receives no industrial effluent, negligible domestic effluent, and has ocean level salinity of approximately 30 ppt, had levels of inclusions similar to hard clams from Tangier Sound and Pocomoke Sound in Chesapeake Bay which is downstream from most of the domestic and industrial sewage input and which has a mean salinity of approximately 15 ppt. In addition, inclusions were found in oysters and soft-shell clams from all sites sampled regardless of their proximity to population centers. Inclusions were found in samples the year around over an 11 year period (in the case of oysters) irrespective of water temperature extremes ranging from 0°C to 30°C.

Inclusions of these obligate procaryotes also seem to be ubiquitous for bivalves regardless of species, location, and depth. We have recently seen them in the mussel, *Brachidontes recurvus*, and three clams : *Macoma balthica*, *Rangia cuneata* and *Tagellus* sp. from the Chesapeake Bay. Additionally, a variety of photographs and/or actual material showing inclusions have become available to us : Couch (personal communication) found inclusions in digestive diverticula of *C. virginica* from the Gulf of Mexico near Pensacola, Florida ; Yevich and Barszcz (personal communication) found them in *C. virginica* in the Houston, Texas, ship channel ; Harshbarger and Hoover (unpublished observations) found them in digestive diverticula of *M. arenaria* from Searsport, Maine ; Yevich and Barszcz (personal communication) found gut goblet cell inclusions and digestive diverticula cell inclusions in *Mytilus edulis* from Delaware and *Mytilus californianus* from California ; Buchanan (1976) found rickettsia-like organisms containing phage particles in *Tellina tenuis* from Scotland ; Farley (personal communication) observed inclusions in digestive diverticula epithelial cells from a species of *Macoma* from a depth of 457 meters off the coast of California ; and, Kern (personal communication) has seen inclusions in a squid, *Loligo pealei*, two scallops, *Argopectin irridiens*, and *Placopecten megallanicus*, the surf clam, *Spisula solidissma*, the mahogany hard clam, *Artica islandica*, and the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, from the western U.S., Korea, and Japan. Rickettsiae have also been reported in *C. gigas* from France (Comps et al., 1977).

Potential sources of obligate procaryotes from non molluscan hosts is endless. Insects and ticks are well known vectors of rickettsiae and/or mycoplasmas. Additionally, rickettsia-like organisms have been reported in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, (Vago et al., 1970), in the amphipod crustacean, *Crangoynx floridanus*, (Federici et al., 1974), and with a phage in the scorpion, *Buthus occitanus*, Morel and Duthoit, 1974 ; Morel et al., 1974, 1976). Fournier et al. (1975) reported a rickettsia infecting the trematode, *Euzetrema knoepffleri*, which was parasitizing an amphibian. Procaryote inclusions, called epitheliocystis, have been seen in fish skin and gill epithelium (Hoffman et al., 1969 ; Wolke et al., 1970 ; Paperna, 1977). Mohamed (1939) reported rickettsiae in fish blood and internal organs. Finally, obligate procaryotes are endogenous to numerous water fowl, domestic fowl, mammals, and plants.

Whatever the source of the infections and regardless of what stresses of temperature, salinity, pollution, etc., The infected bivalves were exposed to at any of the collecting sites and times, there was no evidence of a host defense reaction. We interpret this as meaning that the procaryotes are essentially harmless as far as the health of mollusks is concerned, although, possibly in heavy infections they do slightly reduce the metabolic efficiency of the host and compete with the host for nutrients.

As previously reported (Harshbarger et al., 1977) phages were discovered in some initial bodies of some of the chlaymdia. The phage particles were 50 nm octahedrons with 2,3,4 symmetry in a crystal lattice array. This discovery may provide a tool for the study of chlamydia genetics as well as provide a mechanism for the control of pathogenic chlamydia. There is, however, no known correlation between any obligate molluscan procaryote and diseases of humans.

REFERENCES

BUCHANAN J.S. 1976 - Studies on some intracellular parasites of the marine bivalve, *Tellina tenuis*. *Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling, Scotland.*

CHATTON E. and LWOFF A., 1950 - Recherches sur les Ciliés Thigmotriches. II. *Arch. Zool. Exptl. Gén.*, *86*, 393-485.

COMPS M., BONAMI J.R. and VAGO C., 1977 - Mise en évidence d'une infection rickettsienne ches les Huitres. *C.R. Acad. Sci., Paris, série. D*, *285*, 427-429.

COUCH J.A. FARLEY C.A. and ROSENFIELD A., 1977 - Sporulation of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae), in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, *153*, 1529-1531.

COUCH J.A., - Personal communication.

FEDERICI B.A., HAZARD E.I. and ANTHONY D.W., 1974 - Rickettsia-like organism causing disease in a crangonid amphipod from Florida. *Appl. Microbiol.*, *28*, 885-886.

FARLEY C.A., 1965a - Acid-fast staining of haplosporidan spores in relation to oyster pathology. *J. Invertebr. Pathol.*, *7*, 144-147.

FARLEY C.A., 1965b - Pathologic responses of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), to infection by the protistan parasite, MSX. *Am. Malacol. Union Annu. Bull.*, *32*, 23-24 (abstr.).

FARLEY C.A., 1967 - A proposed life cycle of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, *14*, 616-625.

FARLEY C.A., 1968 - *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, *15*, 585-599.

FARLEY C.A., 1969 - Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* *31*, p. 541-555.

FARLEY C.A., - Personal communication.

FOURNIER A. COMBES C. and VAGO C., 1975 - Mise en évidence de bactéries endocellulaires pathogènes chez le Monogène *Euzetrema knoepffleri*. *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D, 281*, 1895-1896.

HARSHBARGER J.C. CHANG S.C. and OTTO S.V., 1977 - Chlamydiae (with Phages), Mycoplasmas, and Rickettsiae inChesapeake Bay Bivalves. *Science, 196*, 666-668.

HARSHBARGER J.C. and HOOVER K.L. - Unpublished.

HASKIN H.H., 1961 - Delaware Bay oyster mortalities. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst., 13 th Ann. Sess.*, p. 109. (abstr.).

HASKIN H.H., 1962 - The current research program of the oyster research laboratory. *Proc. 1st Natl. Coastal and Shallow Water Res. Conf. (1961)*. Natl. Sci. Found. and Office Naval Res., p. 207-209.

HASKIN H.H. CANZONIER W.J. and MYHRE J.L., 1965 - The history of "MSX" on Delaware Bay oyster grounds, 1957-1965. *Am. Malacol. Union Bull., 32*, 20-21 (abstr.).

HOFFMAN G.L., DUNBAR C.E. WOLF K. and ZWILLENBERG L.O., 1969 - Epitheliocystis, a new infectious disease of the bluegill *(Lepomis macrochirus)*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 35*, 146-158.

KERN F.G., - Personal communication.

MACKIN J.G. 1961 - Status of researches on oyster diseases in North America. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst., 13th Ann. Sess.*, 98-109.

MOHAMED Z., 1939 - The discovery of rickettsia in a fish. Ministry of Agriculture, Egypt. Technical and Scientific Service, Veterinary Section, *Bull., 214*, 1-7.

MOREL G., 1976 - Studies on *Porochlamydia buthi* g.n., sp. n., an intracellular pathogen of the scorpion *Buthus occitanus*. *J. Invertebr. Pathol., 28*, 167-175.

MOREL G. and OLTHOIT J.L., 1974 - Un micro-organisms intracellulaire de type rickettsien chez le Scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sci., Paris, sér. D, 278*, 1991-1994.

MOREL G., VEYRUNES J.C. and VAGO C., 1974 - Infection virale chez la rickettsie du Scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sci., Paris, sér. D, 279*, 1365-1367.

OTTO S.V. and KRANTZ G. - *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* (in press).

PAPERNA I., 1977 - Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae) and grey mullets (*Liza ramada*, Mugilidae). *Aquaculture*, *10*, 169-176.

PERKINS F.O. - Personal communication.

VAGO C., MEYNADIER G., JUCHAULT P., LEGRAND J.J., AMARGIER A. and DUTHOIT J.L., 1970 - Une maladie rickettsienne chez les Crustacés Isopodes. *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D. 271*, 2061-2063.

WEISSENBERG R., 1922 - Mikrosporidien, Myxosporidien und Chlamydozoen als Zellparasiten von Fischen. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, *27*, 41-43.

WEISSENBERG R., 1949 - Cell growth and cell transformation induced by intracellular parasites. *Anat. Rec.*, *103*, 101-102.

WOLKE R.E., WYAND D.S. and KHAIRALLAH L.H., 1970 - A light and electron microscopic study of epitheliocystis disease in the gills of Connecticut striped bass (*Morone saxatilis*) and white perch (*Morone americanus*). *J. Comp. Pathol.*, *80*, 559-563.

YEVICH P.P. and BARSZCZ C.A., - Personal communication.

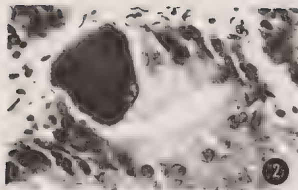
FIGURES

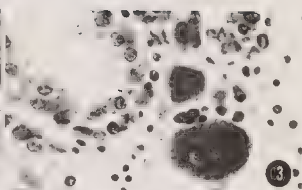
Fig. 1 - Sampling areas : hard clams Y and Z ; soft-shell clams A, B, R, R_1 and X ; oysters A-W.

Figs.2-7 - Inclusions containing obligate procaryotes : (2) chlamydiae in *M. mercenaria* digestive diverticula, 600X ; (3) chlamydiae in *M. mercenaria* - big granules contain phage particles, small granules do not, 600 X ; (4) rickettsia-like organisms in *M. mercenaria* gill connective tissue, 600X ; (5) rickettsiae in *M. arenaria* in digestive diverticula, 150X ; (6) rickettsia-like organisms in *C. virginica* digestive diverticula, 150 x ; and, (7) mycoplasma-like organisms in *C. virginica* gut goblet cells, 600X.

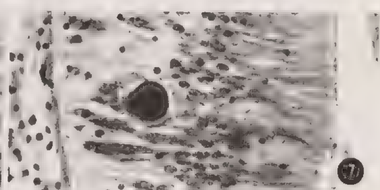


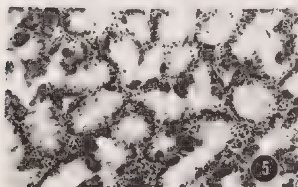
Chesapeake Bay
Region
SCALE
NAUTICAL MILES
STATUTE MILES
SAMPLING AREAS

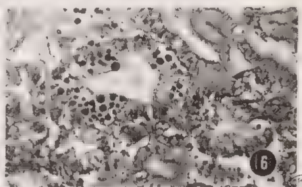

2


3


4


7


5


6

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 297 à 299

OBSERVATIONS ON THE EXPERIMENTAL INFECTION OF *OSTREA EDULIS* WITH TWO MOLLUSCAN VIRUSES

by Barry John Hill[x] and David James Alderman[x]

SUMMARY

Two strains of an IPN-like virus isolated from marine molluscs were tested for pathogenicity in *Ostrea edulis*. High virus levels were reached in the tissues at 8-10°C and histologically, Adema, hemocyte infiltration, and necrosis were observed.

OBSERVATIONS SUR L'INFECTION EXPERIMENTALE D'*OSTREA EDULIS* AVEC DEUX VIRUS DE MOLLUSQUES

RESUME

Deux souches de virus de type NPI isolées de mollusques marins ont été testés quant à leur pathogénicité pour *Ostrea edulis*. Des taux élevés de virus ont été notés dans les tissus à 8-10°C et à l'histologie, des oedemes, l'infiltration d'hémocytes et des necroses furent observés.

Hill (1976a, b) working with a range of marine molluscs reported the isolation of several strains of a virus similar to Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) virus of fish. The virus strains were readily propagated in the fish cell line BF-2 (bluegill fibroblast) and some of their *in vitro* properties have been determined (Hill, 1976a, b ; Underwood et al, 1977). To elucidate their *in vivo* properties two preliminary experiments have been carried out.

In both experiments, populations of 200 *Ostrea edulis* each averaging 2 cm in length and with a mean drained meat weight 0.1 g were held in 40 litre tanks with a base area of 0.28 m^2. With the water supply switched off, a suspension of tissue culture-grown

(x) Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Fish Diseases Laboratory, Weymouth, England.

virus of known infectious titre (plaque-forming units (pfu) in BF-2 cells) was inoculated into the tanks and dispersed thoroughly in the water. The tanks were left without water flow for 20 hours to allow the oysters to take up the virus by their normal filter-feeding mechanism.

In the first experiment, a total inoculum of 7 x 10^7 pfu of infectious virus was introduced into each tank. One group of oysters received a strain isolated from *Tellina tenuis* (TV-1), a second group received a strain isolated from *Ostrea edulis* (OV-3), and a third group (control) received suspension medium. The temperature during the course of the experiment was in the range 8-10°C and in this case, the oysters were not given supplementary food. Sample groups of 10 oysters were taken from each tank at 10-day intervals for virological and histological examination. For virological examination, the meat from 5 oysters was homogenized and titrated for infectious virus. Histological examination was made on the other 5 oysters of the group.

In the second experiment the virus inoculation was 10^8 pfu per tank, the temperature was held at 16-18°C and the oysters were fed with *Tetraselmis sueica.* The populations were samplet at 5-day intervals. The results of the virus isolation tests in both experiments are shown in the table below.

Levels of OV-3 and TV-1 viruses in oysters at various times post-inoculation

Experiment No.	Days post-Inoculation	Virus titre/oyster (pfu)		Virus isolation in T.C.	
		OV-3	TV-1	OV-3	TV-1
	10	1.6 x 10^2	10	+	+
	20	1.7 x 10^4	46	+	+
(1)	30	1.6 x 10^4	2.4 x 10^2	+	+
8-10°C	40	1.5 x 10^4	84	+	+
	50	2.2.x 10^2	0	+	+ (P)
	60	43	0	+	+ (P)
	5	10^2	0	+	+
(2)	10	18	0	+	+ (P)
16-18°C	15	0	0	- (P)	- (P)
	20	0	0	- (P)	- (P)

(P) Result after one passage of inoculated cells

At 8-10°C much higher virus levels were reached with the virus OV-3 remaining at over 10^4 pfu/oyster until day 40, decreasing to a low level by day 60. Virus strain TV-1 peaked at a level of 2.4×10^2 pfu/oyster at day 30 and was untitratable at day 50 although its presence could be demonstrated by passaging cell cultures inoculated with the oyster homogenate. At 16-18°C, OV-3 again titrated higher than TV-1 but reached only 10^2 pfu/oyster on day 5. The strain TV-1 could be detected at days 5 and 10 only by passaging inoculated cell cultures. After day 10 neither virus could be detected even by cell culture passage. The control animals were negative for virus at all times.

The histopathological effects were similar at both temperatures although more pronounced at the lower temperature. At 8-10°C there was a general development of tissue edema with the maximum effect being observed in the digestive gland where hemocyte infiltration and necrosis of connective tissue occurred. The maximum effect appeared to be reached between day 20 and day 30 post-inoculation. Histopathological effects were difficult to interpret after day 30 when significant deterioration of the tissues of the control group was also observed presumably due to the absence of a sufficient food supply in the flowing sea water. At the higher temperature, edema, infiltration, and necrosis reached a maximum at day 20. In both experiments there was a noticeable loss of meat quality and a loss of digestive gland pigmentation in the inoculated groups. Accurate mortalities were difficult to assess in the first experiment because of significant losses in the control group after day 30, presumably due to inadequate food supplies. However, by day 30 in the experimental groups an approximate 40 % mortality level had been recorded. Few mortalities were seen in the oysters infected at 16-18°C.

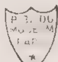
These results indicate that the two virus strains tested infect *Ostrea edulis* and produce a pathological effect on the digestive gland with the effects being more pronounced at 8-10°C than at 16-18°C. Further experiments are currently in progress to explore more fully the effects of these and other virus strains both on molluscs and crustacea.

REFERENCES

HILL B.J., 1976a - Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (da Costa). In : Wildlife Diseases, 686 p. Edited by L.A. Page. New York and London. Plenum Press.

HILL B.J., 1976b - Molluscan viruses : their occurence, culture and relationships. Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology. Queens University Press, Kingston, Ontario, 461 p.

UNDERWOOD, B.O., SMALE C.J., BROWN F. and HILL B.J., 1977 - Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious Pancreatic Necrosis virus. *J. Gén. Virol.*, *36*, 93-108.



Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 301 à 307

INFECTIONS VIRALES CHEZ LES HUITRES
CRASSOSTREA ANGULATA Lmk. et *CRASSOSTREA GIGAS* Th.

par Michel Comps (*) et Jean-Louis Duthoit (**)

RESUME

Deux infections virales associées à des épizooties ont été observées chez *Crassostrea angulata* Lmk. La première concerne la maladie des branchies où les lésions virales sont accompagnées d'une hypertrophie cellulaire alors que, dans la deuxième, les cellules atteintes sont associées à une dégradation du tissu conjonctif.

Les nécroses branchiales avec présence de virus ont été récemment à nouveau observées chez des huîtres portugaises des gisements naturels de la région de Cadix (Espagne). Par ailleurs, l'étude de mortalités estivales (juillet 1977) de l'huître *Crassostrea gigas* Th. a permis de mettre en évidence chez cette espèce un virus du même type que le virus associé aux mortalités massives de l'huître portugaise.

Dans tous ces cas, la morphogénèse virale s'effectue à partir d'une plage cytoplasmique, conduisant à des virions de forme icosaédrique d'une taille de 350 nm. Certaines caractéristiques de ces virus ont permis de les rapprocher du groupe des Iridovirus.

VIRUS INFECTIONS IN OYSTERS
CRASSOSTREA ANGULATA Lmk. and *CRASSOSTREA GIGAS* Th.

SUMMARY

Two virus infections associated with epizootics have been observed in *Crassostrea angulata* Lmk. The first concerns gill disease where virus lesions were associated with hypertrophied cells, while in the second, lesions in cells are associated with connective tissues.

Gill necrosis with virus have been observed recently in portuguese oysters from natural beds of Cadix (Spain). A study of summer mortalities (july 1977) of the oyster *Crassostrea gigas* Th. showed in this species a virus of the same type as the associated with mass mortalities of portuguese oysters.

In all these cases the morphogenesis of 350 nm sized icosahedric virus occurs in a cytoplasmic area. The virus exhibits some caracteristics near those of Iridoviruses.

(*) Laboratoire de Pathologie, Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, 34200 Sète (France)

(**) Station de Recherches de Pathologie Comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S.30380 St.Christol(France) et Université des Sciences et E.P.H.E., 34000 Montpellier (France)

INTRODUCTION

En pathologie des huîtres, si l'on a souvent mis en évidence l'action de parasites divers, pour nombre de maladies, les causes sont restées incertaines sinon inconnues, comme ce fut le cas pour la maladie de Malpèque au Canada (Needler et Logie, 1947) ou encore pour les mortalités massives de l'huître plate en Europe en 1920-1921 (Eyre, 1924).

Les recherches sur les plus récentes maladies et notamment des études systématiques en microscopie électronique ont permis d'établir la possibilité de nouvelles bases étiologiques pour les maladies des huîtres et particulièrement l'action du virus.

Farley et al. (1972) observent, chez *Crassostrea virginica*, des lésions intra nucléaires provoquées par un virus de type Herpès sur des huîtres soumises expérimentalement à des températures élevées (28° à 30°C).

Toutefois, ce n'est qu'en 1976 que devaient être signalées les premières viroses associées à des syndromes pathologiques et des mortalités dans le milieu naturel (Comps et al., 1976 ; Comps et Duthoit, 1976). Elles concernent les deux graves épizooties qui, de 1966 à 1973, ont décimé les élevages et les gisements naturels d'huîtres portugaises, la maladie des branchies et la mortalité massive de 1970-73. Il faut y ajouter les récentes mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas*.

VIROSE ASSOCIEE A LA MALADIE DES BRANCHIES

La maladie des branchies qui a surtout sévi de 1966 à 1972 se manifeste par une nécrose des tissus branchiaux, par un amaigrissement des sujets et, consécutivement, par des mortalités (Arvy et Franc, 1968 ; Deltreil, 1969). Elle a été attribuée par Franc et Arvy (1969) à un prostite nouveau, *Thanatostrea polymorpha*.

Une étude récente en microscopie électronique a permis de préciser l'ultrastructure des cellules géantes caractéristiques des tissus en voie de nécrose, considérées comme appartenant à *Thanatostrea polymorpha* et de noter dans ces cellules l'existence de lésions virales (Comps et Duthoit, 1976).

Le cytoplasme des cellules atteintes est occupé par une aire fuchsinophile (et Feulgen positive) dont les dimensions peuvent atteindre 20 µ à 25 µ et par de nombreuses granulations basophiles (fig. 1), correspondant respectivement à une plage virogène dense aux électrons et à des virions dont on observe différents stades de la formation. A la périphérie de la plage se différenciant des membranes qui, plus ou moins refermées sur elles-mêmes, entourent puis isolent une partie de celle-ci (fig. 2).

Les particules ainsi formées comportent une zone centrale de 250 nm de diamètre, dense aux électrons, suivie d'une couche claire la séparant de deux membranes unitaires accolées limitant la particule dont le contour est alors sensiblement polygonal. Il a été admis

qu'à partir de ce stade, intervient un processus de maturation aboutissant à des particules de structure plus complexe. Les virions matures, libres dans le cytoplasme, comportent en effet une partie centrale dense, de 190 nm de diamètre, entourée d'une couche claire suivie d'une couche opaque d'une épaisseur de 45 nm environ. La particule est limitée par deux membranes unitaires séparées par un espace clair.

Dans les tissus atteints, on observe d'autres cellules géantes plus nombreuses, dont certaines renferment des inclusions chromatoïdes de dimensions très variables (Arvy et Franc, 1968 ; Comps, 1972). En microscope électronique, leur cytoplasme comporte, avec de nombreuses mitochondries, des formations sphériques de 0,5 µ à 1 µ de diamètre, où des stries concentriques denses alternent régulièrement avec des stries claires aux électrons (fig. 3).

Pour le moment, les données connues sur le virus de la maladie des branchies et notamment des ressemblances avec les manifestations pathologiques de la maladie "lymphocystis" des poissons, ont permis certains rapprochements avec le groupe des Iridovirus (Comps et Duthoit, 1976).

VIROSE ASSOCIEE A LA MORTALITE MASSIVE DE L'HUITRE PORTUGAISE (1970-1973)

Un deuxième cas de virose a été signalé chez l'huître portugaise lors de l'épizootie de 1970-1973 qui causa des mortalités massives et entraîna la disparition de cette espèce des parcs ostréicoles français (Comps et al., 1976).

Chez les huîtres malades, le conjonctif est altéré ; il présente de nombreuses lacunes où l'on observe des cellules sanguines et des cellules atypiques, morphologiquement comparables à ces dernières. La présence de ces cellules, qui se sont révélées être le siège de lésions virales, représente le symptôme le plus caractéristique de la maladie.

Les cellules atteintes renferment une aire cytoplasmique de 2 à 3 µ autour de laquelle on peut distinguer, sur coupes semi-fines, des granulations basophiles de 0,3 µ environ (fig. 4).

L'aire fuschsinophile correspond à une plage virogène dense aux électrons. Comme dans le cas de la maladie des branchies, les particules se forment à la périphérie de la plage par différenciation de membranes qui englobent une partie de son matériel (fig. 5). La virogénèse aboutit à des virions de 350 nm (côté à côté) ; le centre de la particule est occupé par une zone dense de 190 nm, autour une couche claire de 20 nm et une couche dense de 25 nm sont limitées par deux membranes unitaires.

Les caractéristiques de ce virus et sa morphogénèse, comparables à celles du virus de la maladie des branchies, ont conduit à le rapprocher des Iridovirus.

VIROSE ASSOCIEE A UNE MORTALITE CHEZ *CRASSOSTREA GIGAS*

L'étude de mortalités estivales (juillet 1977) survenues dans le Bassin d'Arcachon a permis de mettre en évidence une nouvelle infection virale chez l'huître *Crassostrea gigas* (Comps et Bonami, 1977).

Outre des symptômes liés à de mauvaises conditions de milieu, certaines huîtres présentaient une dégradation accusée du conjonctif avec présence de cellules atypiques identiques à celles qui ont été décrites chez *Crassostrea angulata* (mortalités de 1970). En microscopie électronique, on observe dans ces cellules une plage virogène avec des particules en formation à sa périphérie (fig. 6). Libres dans le cytoplasme fortement vacuolisé, les particules matures présentent la même structure que les virus de *Crassostrea angulata*.

CONCLUSIONS

Bien que l'on n'ait pas, dans les trois cas exposés, caractérisé complètement les virus ni reproduit expérimentalement les maladies, des corrélations entre la présence des virus et les différentes manifestations pathologiques ont pu être établies.

Ainsi, dans le cas de la maladie des branchies, on a noté l'existence de cellules géantes avec lésions virales chez des huîtres portugaises, depuis 1968 jusqu'à 1972. Des recherches récentes ont en outre montré que de telles infections virales persistaient en 1977 chez des huîtres portugaises atteintes de la maladie des branchies (gisements naturels du Sud de l'Espagne).

En ce qui concerne la mortalité massive de 1970, on a pu démontrer la présence du virus dès le début des mortalités, au cours de l'été 1970, aussi bien chez des huîtres provenant du Bassin de Marennes-Oléron que chez des huîtres de Bretagne (Rivière d'Etel). Dans le Bassin de Marennes-Oléron, l'étude des mortalités, suivie dans le temps et en fonction des catégories d'âge, a montré que les nouvelles atteintes, chez des sujets de plus en plus jeunes, correspondaient à la présence de lésions virales.

Par contre, dans le récent cas de virose signalé chez *Crassostrea gigas*, on ne dispose pas de corrélation semblable puisqu'il s'agit d'un cas isolé. Cependant, on notera qu'il s'est produit chez une espèce qui, aussi bien durant la maladie des branchies que pendant les mortalités massives de 1970, s'était montrée particulièrement résistante et avait permis d'apporter une solution rapide aux problèmes de la production d'huîtres.

En conséquence, la découverte récente d'un virus chez *Crassostrea gigas* tendrait à indiquer qu'après une acclimatation de six années, la vigueur de cette huître et, consécutivement, son aptitude à résister à certaines maladies, pourraient s'atténuer dans les conditions d'élevage des grands bassins ostréicoles français.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARVY L. et FRANC A., 1968. - Sur un Prostite nouveau, agent de la destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. *C.R. Acad. Sc. Paris*, sér. D, *267* : 103-105.

COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et CAMPILLO A., 1976. - Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk. *C.R. Acad. Sc. Paris*, sér. D, *282* : 1991-1993.

COMPS M. et DUTHOIT J.L., 1976. - Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C.R. Acad. Sc. Paris*, sér. D, *283* :

COMPS M. et BONAMI J.R., 1977. - Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. *C.R. Acad. Sc. Paris*, sous presse.

DELTREIL J.P., 1969. - Remarques sur la croissance en élevage suspendu de *Crassostrea angulata* Lmk. affectée par la maladie des branchies dans le Bassin d'Arcachon. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, *33* (2) : 176-180.

EYRE J.W.H., 1924. - An account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in english oyster beds during 1920 and 1921, port II. *Min. Agr. Fish Invest.*, London, ser. 2, *6* (4) : 29-39.

FRANC A. et ARVY L., 1969. - Sur *Thanatostrea polymorpha* ng, nsp, agent de destruction des branchies et des palpes de l'huître portugaise. *C.R. Acad. Sc. Paris*, sér. D, *268*, 3189-31 90.

NEEDLER A.W. et LOGIE R.R., 1947. - Serious mortalities in Prince Edward Island oysters caused by a contagious disease. *Trans. Roy. Soc. Can.*, ser. 3, sec. 5, *41* : 73-89.

LEGENDE DES FIGURES

Maladie des branchies chez *Crassostrea angulata*

Fig. 1 - Lésion branchiale chez *Crassostrea angulata* ; coupe montrant deux cellules géantes (c.g) avec plages fuchsinophiles (p.f) et granulations basophiles (g.b) ; à proximité on observe le noyau (n.g) d'une troisième cellule géante. G x 1 000.

Fig. 2 - Détail d'une plage virogène (p.v) dans une cellule géante ; à sa périphérie de nombreuses particules en formation et quelques virions matures (v.m). Microscopie électronique. G x 14 000.

Fig. 3 - Détail d'une formation sphérique présente dans le cytoplasme de cellules géantes sans lésions virales. Microscopie électronique. G x 140 000.

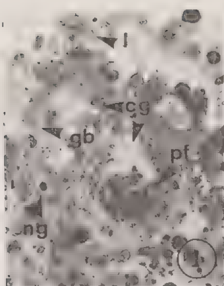
Mortalité massive de 1970 (*Crassostrea angulata*)

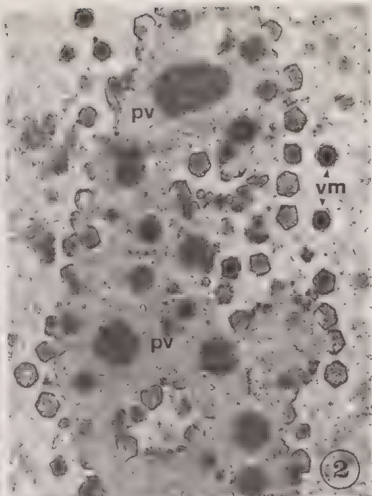
Fig. 4 - Coupe passant par une cellule avec lésion virale : plage fuchsinophile (p.f) et granulations basophiles (g.b). G X 1 500.

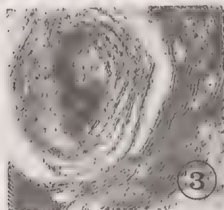
Fig. 5 - Détail de phases de la virogènèse : les systèmes membranaires (s.m) se développent en englobant du matériel de plage virogène (p.v). Microscopie électronique. G x 70 000.

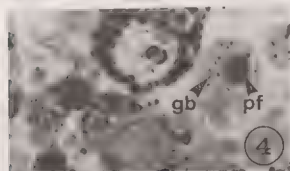
Infection virale chez *Crassostrea gigas*

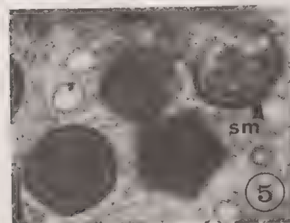
Fig. 6 - Lésion virale cytoplasmique avec particules virales en formation (v.f) et virions matures (v.m). Microscopie électronique. G X 21 000.

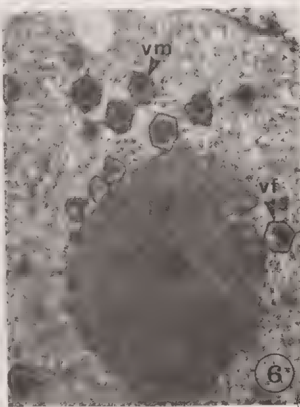

l
cg
gb
pf
ng
1


pv
vm
pv
2


3


gb
pf
4


sm
5


vm
vf
6

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 309 à 316

ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF A RICKETTSIALIKE ORGANISM (WITH PHAGE) FROM THE DIGESTIVE GLAND OF THE MARINE BIVALVE, *TELLINA TENUIS* (DA COSTA)

by James S. Buchanan (*)

SUMMARY

Routine histological studies of populations of the marine pelecypod, *Tellina tenuis* from between the tide levels of sandy beaches in Scotland revealed that up to 75 % contained dense-packed amorphous to finely granular eosinophilic inclusion bodies intracytoplasmically in the secretory and ciliated epithelial cells lining the digestive gland tubules. Ultrastructural studies showed that these inclusions consisted of microcolonies of numerous ribosome rich, double membrane bound, spherical to coccoid and occasionally diplococcoid bacteria having a diameter of 0.2 to 0.5 um. Centrally situated electron-lucent vacuoles were a common feature of these forms. Small chains, giant forms, pleomorphic rods and branching forms were also seen but these were invariably associated with viruslike particles which were often aggregated into paracrystalline arrays. These particles could be isolated by zonal density centrifugation of homogenates of infected *Tellina* digestive gland. They were icosahedral, 67 nm in diameter and had a buoyant density of 1.38. It is believed that this virus is a phage and that is the first description of a phage from a rickettsia.

ETUDE ULTRASTRUCTURALE D'UN ORGANISME DE TYPE RICKETTSIEN (AVEC PLAGE) DE LA GLANDE DIGESTIVE DU BIVALVE MARIN, *TELLINA TENUIS* (DA COSTA)

RESUME

Des études histologiques de routine des populations du pelecypode marin *Tellina tenuis* sur les baies sablonneux d'Ecosse ont révélé que près de 75 % des animaux renferment en groupes denses, des corps d'inclusion granulaires eosinophiles dans le cytoplasme des cellules epithéliales secrétrices et ciliées liant les tubules de la glande digestive. L'étude ultrastructurale a monté que ces inclusions sont composées de microcolonies de nombreuses bactéries de 0,2 à 0,5 um, sphériques coccoides ou diplococcoides riches en ribosomes et limitées par une double membrane. Des vacuoles claires aux électrons de situation centrale sont fréquentes. Des chaines courtes, des formes géantes, des bâtonnets pleomorphes et des formes ramifiées sont aussi visibles en association avec des particules ressemblant à des virus souvent en aggrégats paracristallins. Ces particules ont été isolées par centrifugation en gradiant de densité de broyats de glande digestive de Tellines o,fectées. Elles sont icosaedriques, de diamètre de 67 nm et de densité de 1,38. Il est supposé que ce virus est un phage et que c'est la première description de phage à partir d'une rickettsie.

(*) Unit of Aquatic Pathobiology, University of Stirling, Scotland.

INTRODUCTION

During the past 4 years populations of *Tellina tenuis* have been monitored in order to investigate the role of disease and parasitism in controlling population numbers (Buchanan, 1976). This marine pelecypod is found intertidally at densities up to 5,000 per m^2 on sheltered sandy beaches within Scottish sea lochs (Stephen, 1929a and 1931) and has been the subject of a number of studies (Stephen, 1928 and 1929 b ; Ansell and Trevallion, 1967 ; Trevallion, Steele and Edwards, 1969 ; Trevallion, 1971 ; Trevallion, 1971 ; Mc Intyre, 1970 and Barnett, 1971). These studies provide a baseline against which changes in the structure of present day populations can be measured. They have shown that *Tellina tenuis* is an important food source for young (0 group) flafish and may be a sensitive indicator of pollution. Initial observations of the digestive gland suggested that up to 75 % of populations were infected with a viral disease affecting the secretory cells (Buchanan, 1973), however, this disease is now considered to be caused by an organism closely resembling a rickettsia in all aspects of development and morphology. The presence of masses of paracrystalline arrays of virus now considered to be a phage parasitizing the rickettsialike organism, lead to this initial incorrect diagnostis. Unfortunately two accounts now exist in the literature (Hill, 1976 and Underwood, Smale, Brown and Hill, 1977) linking the initial observation of Buchanan (1973) with the isolation of a virus from *Tellina tenuis* which Hill has designated TV 1. This virus (TV 1) was isolated through the medium of fish tissue culture and has been found to have a buoyant density of 1.32 and a mean diameter of 59 nm. The virus isolated by zonal density centrifugation from homogenates of *Tellina* digestive gland was found to have a buoyant density of 1.38 and a mean diameter of 67 nm. The site of replication TV 1 and TV's 2,3 and 4 (Hill, 1976b) is not yet known. It is hoped that this paper will clarify any confusion that may have arisen from statements linking Hill's Tellina virus isolates with the initial observations of viruslike particles seen in thin section by electron microscopy of *Tellina* digestive glands.

MATERIALS AND METHODS

Tellina tenuis were collected from Aultbea, Loch Ewe ; Kames Bay, Millport, Isle of Cumbrae ; Hunterston Sands, Ayrshire and West Sands St. Andrews, Fife. For light microscopy specimens were fixed in Davidson's fluid, embedded in Paraplast and sectioned at 5 µm on a Leitz microtome. Some sections were stained with haematoxylin and eosin others by the periodic acid-Schiff method of McManus and with phloxine tartrazine using zinc chloride as an alternative to mercuric chloride. Digestive gland smears were stained by the method of Gimenez (1965). This method was used to screen large numbers of individuals for the presence of acid-fast bacteria. Material for electron microscopy was first fixed in a 2.5 % solution of glutaraldehyde in 0.05 M sym-Collidine buffer containing 0.3 M sucrose at pH of 7.4 for two hours at room temperature, rinsed in 6 changes of

buffer and postfixed in 1 % osmium tetroxide in buffer at 4°C. Dehydration was carried out in a graded alcohol series followed by gradual infiltration over 72 hours from 100 % propylene oxide to 100 % Araldite/Epon mix. 2 µm thick sections were cut on a Huxley hand microtome for phase contrast light microscopy and ultra-thin sections were cut on a Reichert ultramicrotome. Routine staining was carried out in a combined 1 % potassium permanganate/ 1 % uranyl acetate stain in double distilled water for 10 minutes. Copper grids were coated in 'Formvar' and reinforced with a vacuum deposited carbon film. Sections were viewed in an AEI'Corinth' and a JEOL 100 electron microscope.

Samples were prepared for zonal density centrifugation as follows. Excised digestive glands were pooled in 5 volumes of tris-saline on ice. Homogenization was carried out either in a Tenbroek grinder by hand or mechanically by a Silversen's small-head blender. Initial clarification was carried out by centrifugation at 45,000 g for 60 minutes. The resultant pellets were resuspended in 0.5M tris buffer, pH 7.6 and reclarified by centrifugation at 1,000 g for 5 minutes. Samples were layered onto a solution of 50 % caesium chloride and spun to equilibrium at 100,000 g for 24 hours in an MSE Mk III Superspeed Ultracentrifuge using a titanium swing-out rotor holding 3x6 ml tubes. Fractions were collected from the base of the tube and the refractive index was measured in an Abbé refractometer. Those fractions containing distinct opalescent bands after zonal density centrifugation were prepared for electron microscopy by placing a drop of the suspension on carbon-formvar grids. After allowing the virus to adsorb for up to one hour in a humid chamber, the grids were drained and the virus stained with 2 % phosphotungstic acid pH 7.2. and then viewed in the electron microscope.

OBSERVATIONS AND RESULTS

Light microscopy showed that a high proportion (up to 75 %) of *Tellina* contained amorhous to finely granular eosinophilic inclusion bodies within central membrane-bound vacuoles in the cytoplasm of secretory and ciliated epithelial cells. These cells together with absorptive cells form the lining of the blindending tubules of the digestive gland. Absorptive cells were never observed to harbour inclusion bodies of the type described above. The first sign of infection appeared to be a small eosinophilic inclusion body in the region normally occupied by the Golgi apparatus. The progressive enlargement of this inclusion, brought about by the growth of the microcolony, resulted in the normally pyramidal secretory cell becoming hypertrophied and spherical in outline. These cells were believed eventually to burst, releasing masses of bacteria into the lumen of the digestive tubules. The inclusions were avidly phloxinophilic when stained with phloxine-tartrazine and fluoresced yellow-orange when stained with acridine orange at pH 6. Smears of infected digestive gland showed that the bacteria retained basic fuchsin when stained by the method of Gimenez.

Electron microscopy showed that these inclusions comprises masses of ribosome rich, spherical to coccoid and occasionally diplococcoid bacteria having a diameter of 0.2 to 0.4 μm. Centrally situated electron lucent vacuoles were a common feature of these forms. Small chains, giant forms, pleomorphic rods and branching filamentous forms were also seen but these were invariably found in association with viruslike particles. These were often aggregated into dense paracrystalline arrays. These was clearly an association between the presence of virus and the more bizarre and variable forms of the bacteria.

It was found possible to isolate these particles from homogenates of *Tellina* digestive gland known to be heavily infected with the rickettsialike organism. Negative staining of opalescent bands produced by zonal density centrifugation of these homogenates showed that they consisted of icosahedral particles, 66-68 nm in diameter. A distinct capsomeric substructure was visible although the number of capsomeres could not be determined. The buoyant density was measured at 1.38.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

A recent report by Harshbarger, Chang and Otto (1977) describes intracytoplasmic chlamydia-like organisms, some with phage, rickettsialike organisms and mycoplasmalike organisms from clams and oysters in the Chesapeake Bay area of the United States. They have suggested that marine bivalves may be acting as alternate hosts for zoonotic microorganisms and that the primary host might be estuarine birds. Preliminary attempts to culture the rickettsialike organism from *Tellina* in embryonated hens eggs were successful and these will be reported in detail at a later date (Buchanan, 1978, in the press). In the light of these findings - and since it is recognized that many zoonotic diseases such as chlamydiosis (Burkhart and Page, 1971) and coxiellosis (Bell, 1971) can be transmitted form birds to man - it has now become a matter of urgency to establish the true nature of these parasitic bacteria from shellfish.

The first record of a phage from an obligately intracellular bacterium was made by Morel, Veyrunes and Vago (1974). They described a polyhedral particle, 66 nm in diameter and having a short tail from a rickettsialike organism subsequently redescribed as *Porochlamydia buthi* of the order Chlamydiales (Morel, 1976). The host is the scorpion *Buthus occitanus*.Harshbarger et al. (1977) have pointed out that the discovery of a chlamydial phage suggests a potential mechanism for the control of pathogenic chlamydiae. It seems likely that these phages probably limit the spread of the disease throughout the population as has been suggested by Morel but the known specificity of bacteriophages and the rapid mutational ability of bacteria make the possibilities from phage therapy seem unlikely.

The rickettsialike organism from *Tellina* most closely approaches the genus *Coxiella* (the agent of Q Fever) in morphology, staining properties and developmental cycle. It seems likely that it will form a new genus in the tribe Rickettsieae of the family Rickettsiaceae but further work on the culture of the organism for the purposes of serology will be necessery before its taxonomic position can be clarified.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANSELL A.D. and TREVALLION A., 1967 - Studies on *Tellina tenuis* (da Costa) I. Seasonal growth and biochemical cycle. *J. exp. mar. Biol. Ecol. 1,* 220-235.

BARNETT P.R.O., 1971 - Some changes in intertidal sand communities due to thermal pollution. *Proc. Roy. Soc. Lond. B. 177,* 353-364.

BELL J.F., 1971 - Q (Query) fever. In : Infectious and Parasitic diseases of Wild Birds, pp 170-171 Eds Davis J.W. Anderson R.C., Karstad L., and Trainer D.O. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

BUCHANAN J.S., 1973. Electron microscopic observations of virus-like particles in the digestive gland of a marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). VI th. Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p 28.

BUCHANAN J.S., 1977 - Studies on some intracellular parasites of the marine bivalve, *Tellina tenuis* (da Costa). Ph. D. Thesis, University of Stirling.

BUCHANAN J.S. 1977 - Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). *J. Fish Diseases 1,* (in press)

BURKHART R.L., and PAGE L.A., 1971 - Chlamydiosis (Ornithosis/Psittacosis) In : Infectious and Parasitic Diseases of Wild Birds. Eds Davis J.W., Anderson R.C., Karstad L. and Trainer D.O. The Iowa State University Press., Ames, Iowa.

GIMENEZ D.F., 1965 - Gram staining of *Coxiella burnetii. J. Bacteriol., 90,* 834-835.

HARSHBARGER J.C., CHANG C.S. and OTTO S.V., 1977 - Chlamydiae (with phages) Mycoplasmas and Rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science, 196,* 666-668.

HILL B.J. 1976a - Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (da Costa). In Wildlife Diseases. Ed Page L.A. pp 452 - 452. New York and London, Plenum Press.

HILL B.J. 1976b - Molluscan viruses : their occurence, culture and relationships. Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology, Kingston, Ontario (in the press).

McINTYRE A.D. 1970 - The range of biomass in intertidal sand with special reference to the bivalve *Tellina tenuis* (da Costa). *J. mar. Biol. Ass. U.K., 50,* 561-575.

MOREL G., VEYRUNES J.C. et VAGO C., 1974 - Infection virale chez la rickettsie du Scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sci., Paris,* Serie D. *279,* 1365-1367.

MOREL G., 1976 - Studies on *Porochlamydia buthi* g.n., sp. n., an intracellular pathogen of the Scorpion *Buthus occitanus. J. Invert. Pathol. 28,* 167-175.

STEPHEN A.C., 1928 - Notes on the biology of *Tellina tenuis* (da Costa). *J. mar. biol. Ass. XV,* 683-702.

STEPHEN A.C., 1929a - Studies on the Scottish marine fauna - the fauna of sandy and muddy areas of the tidal zone. *Trans. Roy. Soc. Edin. LVI,* 291-306.

STEPHEN A.C., 1929b - Notes on the rate of growth of *Tellina tenuis* (da Costa) in the Firth of Clyde. *J. mar. biol. Ass. XVI,* 117-129.

STEPHEN A.C., 1931 - Notes on the biology of some lamellibranchs on the Scottish coast. *J.mar. biol. Ass.* (N.S.) *18,* 51-68.

TREVALLION A., 1971 - Studies on *Tellina tenuis* (da Costa) III. Aspects of general biology and energy flow. *J. exp. mar. Biol. Ecol., 7,* 95-122.

TREVALLION A., STEELE J.H. and EDWARDS R.R.C., 1969 - Dynamics of a benthic bivalve. In Marine Food Chains, Ed J.H. Steele. Oliver and Boyd, Edinburgh.

UNDERWOOD B.O., SMALE C.J., BROWN F. and HILL B.J., 1977 - Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Gen. Virol. 36,* 93-109.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a postgraduate research grant from the Natural Environmental Research Council. I wish to acknowledge the help provided by Dr. M. Whalley of the Animal Leukemia Research Unit at Glasgow University Veterinary School and Dr. C. Madeley of the Regional Virus Laboratory at Ruchill Hispital, Glasgow and my colleagues at the Unit of Aquatic Pathobiology, University of Stirling.

PLATE CAPTIONS

A. The four cells (arrowed) in this electron micrograph (x 750) harbour microcolonies of the rickettsia. Several profiles of vaculilated dead cells (DC) indicate the presence of former inclusions.

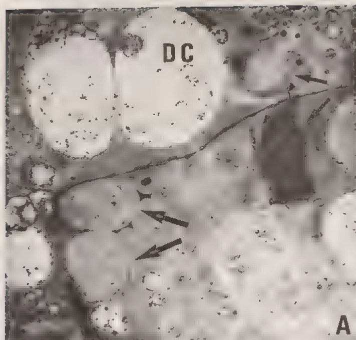
B. Detail (x 8,000) of the cell at top right in A. (small arrow). Numerous scattered virus particles (phage) can be seen in the cytoplasm of the rickettsia. The rough endoplasmic reticulum (ER) of the host cell has swollen cisternae and is arranged in concentric whorls around the membrane bound vacuole containing the rickettsiae. The nucleus (N) appears compressed at the periphery of the host cell.

C. Detail from the 2 colonies of rickettsiae indicated by large arrows in A. The bacterial cells forming the lower colony measure between 200 and 500 nm. Phage particles are absent from the cytoplasm of these bacteria whereas the bacteria in the adjacent upper inclusion are pleomorphic and contain numerous scattered phage particles. These phage containing rickettsiae are 3 or 4 times larger and have reduced electron opacity cytoplasm.

D. Detail from a serial section of the electron dense cell (small arrow) in A above (X 8 000). Note the presence of numerous phage particles. These occasionally form dense paracrystalline arrays.

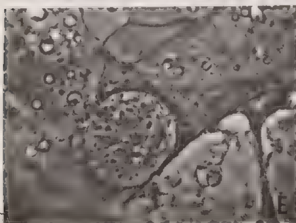
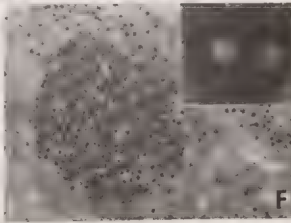
E. Phase contrast light micrograph (x 1 200) of a typical spherical inclusion body from a 2 um section of Araldite/Epon embedded digestive gland. Note the pleomorphic nature of the bacterial cells within the host cell.

F. Paracrystalline arrays (X 15 000) of phage. The structure of the bacterial cell is just discernable. INSET. Phage particles as seen by negative staining.


DC
A

ER

C

D

E

F

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 317 à 321

MICRO-ORGANISMES DE TYPE RICKETTSIEN CHEZ LES HUITRES *CRASSOSTREA GIGAS* Th. et *OSTREA EDULIS* L.

par Michel Comps (*), Gilbert Tigé (**),
Jean-Louis Duthoit (***) et Henry Grizel (**)

RESUME

Des infections rickettsiennes ont été mises en évidence chez les huîtres des côtes françaises de l'Atlantique, *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*. Les micro-organismes parasitent des cellules de l'épithélium des diverticules digestifs sans toutefois entraîner des lésions susceptibles d'affecter gravement les mollusques. En dehors de la forme qui paraît plus allongée dans le cas de la Rickettsie de *Crassostrea gigas*, les caractéristiques de ces deux micro-organismes sont proches ; elles ont permis de les inclure dans l'ordre des Rickettsiales.

RICKETTSIA-LIKE MICRO-ORGANISMS IN OYSTERS *CRASSOSTREA GIGAS* Th. et *OSTREA EDULIS* L.

SUMMARY

Rickettsia infections have been found in oysters from French Atlantic coasts, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Digestive tubule cells are infected but without serious injury for the molluscs. The caracteristics of these micro-organisms are comparable, so they have been inclued in order Rickettsial.

° ° °

Les études effectuées en matière de pathologie des mollusques bivalves marins et notamment des espèces commerciales ont conduit ces dernières années à mettre en évidence de nouveaux agents pathogènes pour ces dernières.

Dans ce domaine, les plus récents progrès concernent les micro-organismes de type rickettsien.

(*) Laboratoire de Pathologie, Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, 34200 Sète (France)

(**) Laboratoire de Biologie Conchylicole, Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, 56470 La Trinité sur Mer (France)

(***) Station de Recherches de Pathologie Comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S., 30380 SAINT-Christol (France)

Chez *Mercenaria mercenaria*, Harshbarger et al. (1977) ont signalé la présence d'une chlamydie avec phages et d'une rickettsie. Dans le même temps, une infection rickettsienne devait être observée dans la glande digestive de *Crassostrea gigas* sur un lot d'huîtres provenant du bassin de Marennes-Oléron tandis qu'il était noté que des cas semblables avaient été reconnus au microscope photonique chez des huîtres plates *Ostrea edulis* (Comps et al., 1977). Il semblerait d'ailleurs que cette espèce représente un terrain privilégié pour ce type de micro-organisme comme le montre le tableau ci-dessous où sont répertoriés les cas d'infections rickettsiennes observées depuis 1974.

Huîtres	Date de prélèvement	Lieu d'origine	Taux de sujets infectés
	7.5.74	Arcachon (natives)	1 / 20
	24.9.76	Californie (naissain produit en écloserie)	1 / 60
	10.3.77	Arcachon	1 / 20
Ostrea edulis	15.4.77	Arcachon (huîtres de 18 mois provenant de Bretagne)	1 / 20
	9.6.77	Bretagne (rivière de Saint-Philibert	
	3.8.77	" " "	-
	8.6.77	Bretagne (La Trinité)	1 / 20
Crassostrea gigas	30.3.77	Bassin de Marennes-Oléron (Avert)	1 / 10

Chez *Crassostrea gigas*, l'infection se manifeste par l'existence de plages de 10 à 30 µ de diamètre situées dans des vacuoles à l'intérieur de cellules de l'épithélium digestif (fig. 1). Finement granuleuses, ces plages sont Feulgen positives ; elles renferment un grand nombre de micro-organismes d'un diamètre de 500 à 600 nm et d'une longueur de 1,5 à 2,5 µm. Ceux-ci, limités par deux membranes unitaires séparées par un espace clair contiennent un matériel granuleux plus dense à la périphérie (fig. 2).

Ce micro-organisme a été classé dans l'ordre des Rickettsiales sans toutefois pouvoir préciser davantage sa position. On rappellera qu'il n'a pas été établi de lien entre la présence de cette rickettsie et des manifestations pathologiques telles que des mortalités (Comps et al., 1977).

Comme dans le cas de l'huître du Pacifique, on a observé chez l'huître plate *Ostrea edulis* des symptômes d'infection rickettsienne au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs, parfois même conjointement avec le dangereux parasite *Marteilia refringens* (GRIZEL et al., 1974), (fig. 3).

On distingue en effet dans ces tissus la présence de plages plus ou moins ovales, de 30 à 50 µ, formées de nombreuses et fines granulations très chromophiles et positives à la réaction de Feulgen.

Intracellulaires, ces plages occupent une vaste vacuole au sein d'un cytoplasme profondément modifié. Celui-ci comporte en effet de nombreuses petites vacuoles sphériques (de 2 à 3 µ de diamètre) séparées par un réseau ténu de matériel plasmatique (fig. 4).

La cellule atteinte est fortement hypertrophiée et sa taille peut dépasser 70 µ. Cette intense vacuolisation du cytoplasme, qui par ailleurs entraîne une altération du noyau (fig. 4), est caractéristique des cellules lésées.

Les micro-organismes contenus dans la grande vacuole sont de forme sensiblement ovoïde, mesurant 0,5 à 0,7 µ avec un diamètre moyen de 450 nm (fig. 5). La partie centrale est occupée par un matériel granuleux opaque aux électrons, avec une zone plus dense à la périphérie. Le système membranaire limitant le micro-organisme, d'une épaisseur de 300 Å, est constitué de deux membranes unitaires séparées par une couche claire de 100 Å (fig. 6).

Certaines plages, qui se distinguent en microscopie photonique par un aspect granuleux très irrégulier, sont formées de micro-organismes du même type que les précédents mais dont les structures paraissent plus ou moins modifiées avec, en particulier, le système membranaire fortement dégradé.

Les caractéristiques de ce micro-organismes, voisines de celles de la rickettsie trouvée chez *Crassostrea gigas*, permettent de l'inclure comme cette dernière dans l'ordre des Rickettsiales.

L'action pathogène de cette rickettsie, si elle se manifeste par des lésions cytoplasmiques et probablement nucléaires, n'en reste pas moins limitée à un nombre très faible de cellules et, consécutivement, ne semble pas devoir entraîner de troubles graves pour l'huître.

Toutefois, on retiendra que la présence de micro-organismes de type rickettsien chez les huîtres paraît devenir un phénomène plus fréquent, notamment chez les huîtres plates. On peut en mesurer l'importance en rappelant, à l'instar de Harshbarger et al. (1977), que nombre de micro-organismes de ce groupe sont la cause de maladies graves chez l'homme et chez de nombreux animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

COMPS M., BONAMI J.R. et VAGO C., 1977. - Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. *C.R. Acad. Sci. Paris*, sér. D (sous presse).

GRIZEL H., COMPS M., COUSSERANS F, BONAMI J.R, VAGO C., 1974 - Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelles de l'huître plate. *C.R. Acad. Sc. Paris, D, 279*, 783-784.

HARSHBARGER J.C., SING CHEN CHANG et OTTO S.A., 1977. - Chlamydiae (with Phages), Mycoplasmas and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. *Science, 196* : 666-668, 1 fig.

LEGENDE DES FIGURES

Fig. 1 - Coupe d'épithélium digestif de *Crassostrea gigas* avec plage de rickettsies (pr). G x 1 000.

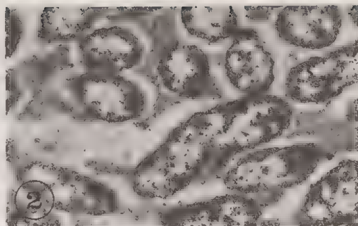
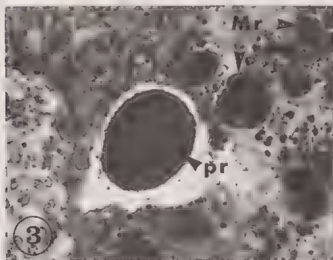
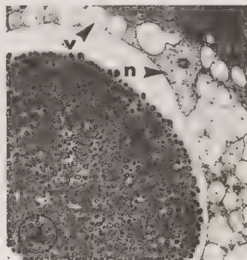
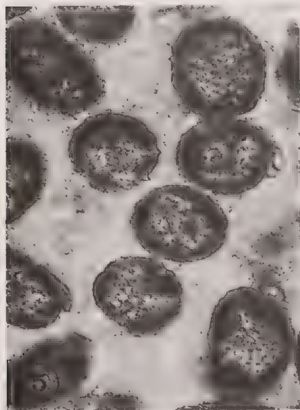
Fig. 2 - Vue détaillée des rickettsies de *Crassostrea gigas*. Microscopie électronique. G x 65 000.

Fig. 3 - Plage de rickettsies (pr) chez *Ostrea edulis* avec différentes formes de *Marteilia refringens* (Mr.). G. x 1 000.

Fig. 4 - Coupe montrant les lésions cytoplasmiques chez *Ostrea edulis* : vacuoles (v) et noyau altéré (n). G x 3 400.

Fig. 5 - Détail d'une plage de rickettsies chez *Ostrea edulis*. Microscopie électronique. G x 50 000.

Fig. 6 - Détail du système membranaire de la rickettsie d'*Ostrea edulis* (membranes unitaires mu). Microscopie électronique. G x 112 000.


pr
1

2

Mr
pr
3

v
n

5

mu
6

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 323 à 326

EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE DE LA GLANDE DIGESTIVE DE L'HUITRE PLATE : HYPOTHESES SUR LE CYCLE DE *MARTEILIA REFRINGENS*

par Georges Balouet, Annie Cahour, Claude Chastel (*)

RESUME

La maladie de la glande digestive de l'huître plate n'a pu être à ce jour reproduite en aquarium ; dans le milieu naturel, les huîtres sont infectées en juillet-août.

En Bretagne, les zones d'élevage peuvent être classées en régions très infectées, moyennement sensibles ou actuellement saines.

La distribution épidémiologique de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis* est étroitement liée aux facteurs de milieu ; la mise en évidence récente du parasite chez *Crassostrea gigas* met en relief l'importance de l'équilibre entre l'agent pathogène et son hôte.

EPIDEMIOLOGY OF FLAT OYSTER DIGESTIVE TRACT DISEASE : HYPOTHESIS ON *MARTEILIA REFRINGENS* CYCLE

SUMMARY

Flat oyster digestive gland diseasehas not been to day experimentally reproduced in laboratory ; in seawater, oysters are infected in july-august.

In Britanny, growing areas can be classified in highly infected, averagely susceptible and, at present, free areas.

Current epizootic status of *Marteilia refringens* in *Ostrea edulis* has close connection with environmental factors ; recent detection of this parasite in *Crassostrea gigas* points out the importance of equilibrium between the pathogen and its host.

INTRODUCTION

Les dommages considérables causés en France à la culture de l'huître plate *Ostrea edulis* L. par la maladie connue, depuis son apparition en 1967, sous le nom de "Maladie des Abers" (maladie de la glande digestive) nous ont conduits, depuis 1974, a entreprendre des études morphologiques et surtout épidémiologiques concernant le cycle du parasite responsable et les modalités de contamination de l'huître (**).

(*) Laboratoires de Pathologie et de Virologie, Faculté de Médecine, 29279 Brest Cédex (France)

(**) Les recherches ont été réalisées grâce à un contrat universitaire (U.B.O.), avec un Groupe d'Ostréiculteurs de la région de Bretagne ; depuis 1977, elles ont bénéficié d'un contrat C.N.E.X.O. (77/1690)

L'AGENT PATHOGENE, *MARTEILIA REFRINGENS* (Grizel et al., 1974 a et b).

Dans l'ignorance où nous sommes de la position taxonomique précise du parasite, nous pensons important de distinguer dans les formes infectieuses de *M. refringens* des plasmodes jeunes et des plasmodes anciens, ces derniers étant les seuls à posséder les inclusions réfringentes, vivement éosinophiles sur coupes histologiques, caractéristiques de l'espèce.

Nous avons par ailleurs isolé, à Brest, à partir d'huîtres infectées, deux souches virales : il s'agit d'un Paramyxo-virus (Para Influenza 2, sous-type SV 5) et d'un virus apparenté aux Réovirus, pour lesquels nous posons la question d'un éventuel rôle "activateur" dans l'evolution du parasite.

MODES DE CONTAMINATION DE L'HUITRE PLATE PAR *MARTEILIA REFRINGENS*

Le haut degré de contagiosité de la maladie des Abers, qui était apparu évident après son extension en 1974, semble en fait étroitement dépendant de nombreux facteurs de milieu.

1) Les essais de reproduction expérimentale de la maladie, entrepris à Brest par différentes méthodes en aquarium - telles que : injection de broyats d'huîtres infectées, seuls ou associés aux souches virales citées ; séjour en milieu contaminé ; expériences de "feeding" et de "proximity" -, se sont toujours soldés par des échecs.

2) En milieu naturel, deux séries expérimentales effectuées en 1975 au Tinduff et en 1976 à Landevennec (Rade de Brest) ont montré, par des immersions échelonnées d'huîtres saines en zone contaminée et des contrôles répétés, que l'apparition des parasites sur coupes histologiques se fait toujours en juillet-août, quelle que soit la durée du séjour (de un à sept mois) en zone infectée (fig. 1). La contamination est massive (86 à 100 % des huîtres examinées) ; elle est restée stable d'août à décembre, cependant que les lots immergés postérieurement au mois d'août sont restés indemnes jusqu'aux plus récents contrôles.

EPIDEMIOLOGIE

1) Méthodologie : sur le plan du dépistage pratique, comme pour les études statistiques portant actuellement sur plus de 9.000 huîtres, nous classons les lots de 10 à 30 huîtres examinées histologiquement en quatre groupes :

- groupe I : absence de toute forme infectieuse ;
- groupe II : lésions de nécrose cellulaire non spécifique ;
- groupe III : formes infectieuses plasmodiales dans 10 à 30 % des huîtres du lot ;
- groupe IV : formes infectieuses dans 40 à 100 % des huîtres.

2) Variations saisonnières : une expérimentation menée à Quelern-Roscanvel, en 1975,

a confirmé que le pourcentage des huîtres infectées trouvé dans les lots examinés mensuellement augmentait à partir de mai (0 à 23 % de février à juin), pour atteindre un taux maximum en août-septembre (43 - 50 %) et décroître ensuite (26 % en décembre).

3) Malgré ces variations, les observations faites sur les trois dernières années permettent de dégager les grands traits de la situation épidémiologique en 1977, distinguant :

a) les zones à "haut risque", lourdement infectées en 1974, et où la maladie a évolué de façon irrémédiable, aboutissant à la destruction des parcs et des bancs. Ces zones correspondaient aux huîtres classées dans le groupe IV (infection supérieure à 40 %) et concernent la partie Est de la Rade de Brest, ainsi que la Baie de Morlaix-Carantec ;

b) les zones moyennement infectées en 1974, où les huîtres étaient classées dans le groupe III et où la maladie a persisté, mais sans s'étendre. Ces zones "équilibrées", où l'élevage a pu être poursuivi, sont celles de la partie Ouest de la Rade de Brest, de la région du Morbihan et de la Baie de Paimpol ;

c) les régions "protégées" de Binic - Saint-Brieux et de Quiberon, où aucun développement de la maladie n'a été noté à ce jour.

INTERPRETATION GENERALE

La maladie de l'huître plate apparaît aussi comme un conflit hôte-agent infectieux :

1) L'hôte : toutes les variétés d'*O. edulis* sont sensibles, sans résistance spontanée, avec seulement une sensibilité apparemment plus faible des jeunes naissains.

En mai 1977, nous avons mis en évidence, dans la région de Carantec, des formes jeunes de *M. refringens* chez *C. gigas* L. : ce fait traduit sans doute une modification dans la sensibilité de cette huître.

2) L'agent infectieux : les variations saisonnières signalées dans les taux d'infection des huîtres sont accompagnées de différences dans la répartition des formes infectieuses : en période hivernale, les plasmodes anciens, contenant des inclusions, sont pratiquement absents ; des numérations précises de la répartition des formes infectieuses lors de l'expérience de Landevennec montrent que les plasmodes jeunes apparaissent les premiers et restent les éléments les plus nombreux en période estivale ; les plasmodes anciens sont surtout rencontrés entre septembre et novembre, puis diminuent pour disparaître à peu près complètement à partir de janvier.

On peut donc envisager une signification différente des deux types de plasmodes : les formes jeunes constitueraient la forme d'infestation permanente, présente toute l'année et capable, à partir de juin, d'une importante multiplication dans les tissus de l'huître. Les plasmodes anciens, dérivant des premiers, ont une durée d'évolution beaucoup plus courte, aboutissant aux formes de dissémination en dehors de l'huître.

3) Les rapports hôte - agent infectieux : les variations dans les taux d'infestation des différentes zones évoquent l'intervention d'un hôte intermédiaire, qui reste à découvrir.

Il convient avant tout de retenir, pour l'ensemble des zones étudiées, l'importance des facteurs d'environnement, tels le médiocre renouvellement de l'eau de mer dans les fonds d'estuaires, zones de prédilection de l'épizootie, ou la dégradation du milieu par l'utilisation intensive des parcs ostréicoles.

Ces facteurs régissent certainement l'équilibre toujours fragile qui s'établit, comme dans toute maladie infectieuse, entre l'agresseur et l'agressé, le parasite et son hôte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GRIZEL H., COMPS M., COUSSERANS F., BONAMI J.R. et VAGO C., 1974a - Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. *C.R. Acad. Sc. Paris, D, 279* : 783-784.

GRIZEL H. COMPS M. BONAMI J.R. COUSSERANS F. DUTHOIT J.L. LE PENNEC M.A., 1974b - Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis L. Bull. Inst. Pêches Mar. 240* :7-30.

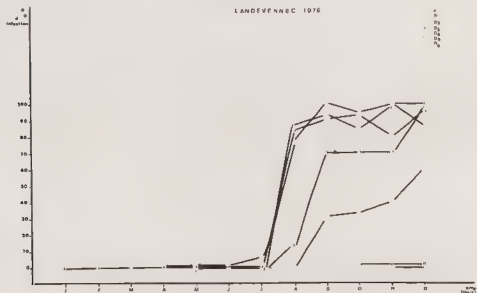


Fig. 1 : Contamination d'Ostrea edulis en milieu naturel.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 327 à 330

OBSERVATIONS SUR LE CYCLE DE *MARTEILIA REFRINGENS*

par Henri Grizel (*) et Gilbert Tigé (*)

RESUME

Les observations sur le cycle de *Marteilia refringens* en microscopie photonique et électronique nous ont conduits à réaliser *in situ* des expériences d'infestation expérimentale. La période d'infestation a varié, suivant les rivières, du mois de mai au mois d'août. L'hiver, le parasite paraît être éliminé des tissus de l'huître.

OBSERVATIONS ON THE CYCLE OF *MARTEILIA REFRINGENS*

SUMMARY

Observations on the cycle of *Marteilia refringens* in light and electronic microscopy led us to realise *in situ* experiences of experimental infestation. According to the rivers, the period of infestation varied, between may and august. During the winter, the parasite seems to be absent from the tissues of the oyster.

INTRODUCTION

En 1969, une maladie était mise en évidence, dans les Abers, chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. Le parasite responsable de celle-ci se propageait assez rapidement (Tigé et Morel, 1974 ; Grizel et al., 1976), perturbant ainsi la culture de cette huître dans les différentes zones ostréicoles des côtes françaises et plus particulièrement en Bretagne. Devant cette situation, différents travaux ont été entrepris pour connaître le parasite (Grizel et al., 1974 ; Perkins, 1976), mais aussi et surtout, sur le terrain, d'importantes opérations de diagnostic ont été réalisées, assorties d'expériences destinées à mettre en évidence les variations du développement du parasite chez l'huître.

MATERIELS ET TECHNIQUES

Sur les parcs, les essais sont réalisés avec du naissain placé en élevage dans des poches ostréophiles posées sur des tables d'élevage. Le diagnostic est pratiqué sur des huîtres de tout âge, prélevées par nos soins ou apportées par les professionnels.

(*) Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes,
12 rue des Résistants, 56470 La Trinité sur Mer (France)

Au laboratoire, après un examen macroscopique et des mesures de poids et longueur, les huîtres sont fixées par le liquide de Bouin ou de Davidson et incluses dans la paraffine. Les coupes sont traitées par l'Hémalun-éosine ou par la coloration de Barbeito-Lopez.

DIAGNOSTIC

Le but du diagnostic est de renseigner les ostréiculteurs sur l'état épidémiologique de leurs huîtres, mais aussi sur l'avance ou la régression de la maladie dans les secteurs de culture.

Il n'existe pas de signes cliniques macroscopiques spécifiques ; seule la lecture de coupes histologiques permet de déceler le parasite. Le tableau (*), ci-après, regroupe l'ensemble des résultats obtenus dans 9 centres bretons en 1977.

Mois / Centres	janvier	février	mars	avril	mai	juin
Golfe du Morbihan	27/38	4/20	0/20	3/40	7/56	40/82
Rivière d'Auray	46/77	6/58	0/60	1/29	1/90	4/72
Rivière de Saint-Philibert	1/60	1/40	0/420	0/140	5/66	3/105
Rivière de Crach	94/157	3/40	0/390	11/225	64/234	63/239
Baie de Quiberon	0/276	0/152	0/360	0/240	0/270	4/156
Rade de Brest	49/164	4/30	12/110	1/40	-	-
Penzé	37/38	19/36	19/35	8/32	11/30	11/50
Rivière de Morlaix	7/20	11/38	9/40	2/15	-	16/60
Paimpol	30/100	34/180	16/160	30/180	11/100	22/80

(*) Le premier chiffre indique les huîtres parasitées, le deuxième les huîtres examinées.

En Bretagne sud, durant les mois de mars et avril, une baisse très sensible du pourcentage d'huîtres parasitées est constatée. Cette période correspond probablement à l'élimination des formes évoluées, sporanges de Perkins (1976). Celle-ci est brève car, dès le mois de mai, des jeunes formes sont remises en évidence dans l'estomac des huîtres. En Bretagne nord, cette baisse est moins nette, le cycle se perpétuant.

Il faut noter aussi le comportement particulier de la rivière de Saint-Philibert où la maladie n'a pas eu une évolution ascendante comme en rivière de Crach. Ces deux rivières avaient été trouvées parasitées, pour la première fois, en septembre 1975.

Enfin, la parasitose ne sévit pas en baie de Quiberon, le résultat du mois de juin étant à attribuer à un lot d'huîtres transféré d'un secteur atteint.

D'après ces résultats, nous voyons que si les professionnels sont bien informés, il est difficile de comprendre le cycle d'évolution, dans le temps, du parasite, car les échantillons observés sont très variés et subissent parfois de nombreux transferts.

ESSAI D'INFESTATION EXPERIMENTALE

Au mois de mars 1976, du naissain de l'année 1975, capté au Pô (baie de Quiberon) et indemne de parasites, a été transféré dans quatre rivières atteintes par la maladie. Un lot témoin est resté au Pô. Des résultats obtenus, donnés dans le tableau ci-après, il ressort que :

- la période d'infestation se situe, suivant les rivières, dans une fourchette comprise entre le mois de mai et le mois d'août, à l'exception de la rivière de Morlaix. Toutefois, pour cette dernière, les résultats acquis cette année indiquent que la période d'infestation dans cette rivière s'inscrit bien aussi dans l'écart mentionné ci-dessus ;
- le cycle, chez de jeunes huîtres nouvellement parasitées, suit la ligne générale d'évolution mise en évidence par l'analyse des résultats du diagnostic, avec une période d'élimination des formes connues du parasite, et ceci de façon plus nette en Bretagne sud ;
- la station témoin est toujours indemne.

Mois / Stations	1976									1977						
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Rivière d'Auray	0/50	1/20	4/20	3/20	8/20	18/19	17/20	17/20	18/20	11/20	3/20	0/20	0/17	2/20	6/20	6/18
Rivière de Crach	0/50	0/20	0/20	1/20	1/18	15/20	22/25	17/19	20/22	12/20	0/20	0/20	0/17	2/23	3/20	2/20
Penzé	0/50	0/20	0/20	0/20	1/20	10/20	15/20	15/20	18/18		11/20	8/20	6/20	6/18		14/15
Rivière de Morlaix	0/50	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	0/20	4/20	7/20		1/20	5/20	2/15	9/20	7/20	9/20
Le Pô témoin	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

(*) Le premier chiffre indique les huîtres parasitées, le deuxième les huîtres examinées.

CONCLUSION

L'ensemble de ces observations permet actuellement de classer les secteurs d'élevages en : très sensibles aux parasites (élevage à proscrire), peu sensibles, les seuls exempts à notre connaissance étant la rivière de Saint-Philibert et l'entrée de la rade de Brest (Roscanvel), enfin indemnes (principalement Quiberon, Binic, Cancale) où l'élevage peut être réalisé avec les aléas que comportent chacune de ces régions.

Par ailleurs, il apparaît que la période d'infestation est bien déterminée dans le temps, les expériences récentes ayant confirmé les premiers résultats, et que les différents stades du parasite connus dans l'huître évoluent selon un cycle annuel, l'élimination de ces phases se faisant dans certaines régions en fin d'hiver.

Enfin, cet acquis va servir de base à une série d'expériences dont les résultats devraient permettre de mieux connaître ce cycle et aussi de définir la possible utilisation de certains parcs par des professionnels désireux de le faire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. et LE PENNEC M.A., 1974. - Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêche Marit., 240 :* 7-30.

GRIZEL H., TIGE G. et RABOUIN M.A., 1976. - Données sur la situation de la maladie de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Cons. Int. Explor. Mer, C.M.K. 18 :* 1-7.

PERKINS F.O., 1976. - Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*. Taxonomic implications. *J. Protoz., 23* (1) : 64-74.

TIGE G. et MOREL M., 1974. - Extension de la maladie de la glande digestive de l'huître plate en Bretagne. *Cons. Int. Explor. Mer, C.M./K 37 :* 1-3.

Haliotis, 8, 1977, (1979)
p. 321 à 337

RECHERCHES SUR LA CULTURE DE CELLULES DE MOLLUSQUES MARINS

par François Cousserans (*)

RESUME

Des milieux de cultures pour cellules de mollusques marins ont été élaborés après analyse des constituants minéraux et organiques, de la pression osmotique et du pH de l'hémolymphe d'huîtres et de moules. Avec de tels milieux ont été obtenus des cultures de cellules en couches monocellulaires de longue durée notamment avec le tissu cardiaque de *Crassostrea angulata, C. gigas, Ostrea edulis* et *Mytilus galloprovincialis*. Ces cultures ont permis l'étude *in vitro* de certaines infections à protistes ou à virus de ces mollusques.

STUDIES ON CELL CULTURE OF MARINE MOLLUSCS

SUMMARY

Culture media have been composed for oysters and mussels after the analysis of the mineral and organic components and the determination of the osmotic pressure and pH of the hemolymph of these marine molluscs. Monolayer cell cultures have been obtained with cardiac tissue from *Crassostrea angulata, C. gigas, Ostrea edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. They allowed *in vitro* study of protistan and virus diseases of these mollusks.

Malgré l'évolution particulièrement rapide de la culture de tissus d'invertébrés, essentiellement depuis le premier Colloque International de ce secteur (Montpellier 1962), peu de travaux ont été réalisés sur les cultures cellulaires des invertébrés marins et l'étude *in vitro* de la pathogénèse des agents rencontrés chez ces animaux est à peine abordée. La raison principale de cette lacune est sans aucun doute l'insuffisance du perfectionnement des cultures elles mêmes dont le maintien rencontre toujours des difficultés.

La première culture de cellules de Mollusques marins a été réalisée par Vago et Chastang (1960) à partir du tissu cardiaque d'huitres. Depuis, d'autres cultures ont été annoncées avec plus ou moins de succés quant à la survie et à la multiplication des cellules cultivées. (Tripp, 1963 ; Tripp et al. 1966 ; Li et al. 1966 ; Perkins et Menzel 1964 ; Wallis 1972 ; Cousserans et al; 1974 ; Cousserans 1975).

(*) Laboratoire de Pathologie Comparée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc et E.P.H.E. 34060 Montpellier, France

Chardonnet et Peres (1963) ont tenté la mise en culture des tissus de moules, Doutko (1967) signale des cultures transplantables de cellules d'hépatopancréas de moules mais qui ne se trouvent pas inscrites au catalogue des lignées cellulaires (Hink 1972 ; 1976). Les tissus et organes de Céphalopodes ont été maintenus *in vitro* (Necco et Martin 1963 ; Marthy 1975).

Nos essais de mise en culture de cellules de Mollusques marins ont porté sur les huitres *Crassostrea angulata* LmK avant sa disparition des côtes françaises, *Crassostrea gigas* Th., *Ostrea edulis* L. et sur la moule *Mytilus galloprovincialis* LmK.

Les cultures ont été obtenues à partir d'explants ou de fragments d'organes prélevés de façon aseptique et après dissociation enzymatique avec une solution de trypsine à 0,25 % ou chimique et enzymatique avec un mélange trypsine- EDTA (0,25 % de trypsine et 0,05 % d'EDTA).

Les cellules ont été cultivées en goutte pendante, en tube à fond plat, en boite de Pétri ou en fiole Falcon.

La composition du milieu de culture pour le développement et le maintien des cellules est donné dans le tableau I. Ce milieu tient compte des valeurs des différents constituants minéraux, organiques, de la pression osmotique et du pH de l'hémolymphe de ces Mollusques. Ce milieu a été établi à partir du système de standardisation des milieux de Vago et Quiot (1969).

TABLEAU 1 : Milieu de culture N° XII

- Fraction A : Solution organique du TC 199 x 5.............................. 40 ml
- Fraction B : Antibiotiques
  - Péricilline.................. 10 UI
  - Streptomycine................ 5 mg
  - Polymyxine................... 10 mg
  - Mycostatine.................. 3 mg
- Fraction C :
  - Sérum de veau foetal.. 10 ml
- Fraction D :
  - Solution saline... 50 ml
- Fraction E :
  - Taurine...................... 10 mg
  - Glycocolle................... 5 mg
  - Alanine...................... 5 mg
  - Acide aspartique............. 3 mg
  - Acide glutamique............. 3 mg
  - Glucose......................100 mg
  - Rouge de phénol à 1 %... 1 ml

Milieu tamponné à pH 6,9 : Δt = - 1,95°C.

Avec ce milieu de culture nous avons pu cultiver des cellules d'huitres et de moules provenant du coeur, de la membrane péricardique, du manteau, des branchies et de la glande digestive.

A partir des explants d'huitres dès les premiers jours de culture apparaissent des cellules qui adhèrent et s'étalent aux surfaces du récipient (Fig. 1). Ces cellules, allongées, possèdent des pseudopodes très longs qui leur permettent de se déplacer sur le substrat. Une semaine après la mise en culture, les pseudopodes des cellules s'enchevètrent (Fig. 2) pour former plus tard un large tapis cellulaire (Fig. 4). Ces couches vont subir de profonds remaniements pour donner des cellules de type épithélial, caractérisées par une zone granuleuse autour du noyau et une zone hyaline périphérique. Ces cellules se maintiennent ainsi pendant plusieurs mois avec augmentation de la surface des couches.

Avec le tissu cardiaque des moules, une migration peu importante se produit pendant les premiers jours. Ce n'est qu'à partir de la deuxième semaine que l'on observe une migration intense de fibroblastes qui se présentent comme des cellules allongées atteignant 35 µ de long (Fig. 3). Le cytoplasme granulaire est concentré dans la région nucléaire de la cellule. Le noyau, de forme ovoide, occupe la région médiane de la cellule. Le développement du tapis cellulaire est comparable à celui des cultures de tissus d'huitres.

L'évolution des cultures obtenues après dissociation enzymatique des tissus précisés plus haut est semblable à celle des cultures provenant d'explants avec cependant une constitution plus rapide et plus homogène de tapis cellulaire.

L'obtention de ces primo-cultures de Mollusques marins a rendu possible une nouvelle voie d'investigation dans l'étude étiologique des grandes épizooties des Mollusques marins. Ainsi, un protiste a pu être mis en évidence dans les cultures de cellules cardiaques de l'huitre japonaise (Cousserans et al. 1974). Dans les tapis cellulaires nous avons observé en position cytoplasmique des corps sphériques présentant un noyau excentré, quelques mitochondries et de nombreux ribosomes. A l'examen en microscopie électronique ces formations apparaissent séparées de la cellule hôte par un système membranaire formé de six membranes groupées deux à deux (fig. 5). Lorsque ces corps sont libres dans le milieu de culture, ils sont limités par une paroi et sont constitués d'un certain nombre de cellules identiques. Ils possèdent un chondriome volumineux sous forme de mitochondries flexueuses à crêtes tubulaires. Partiellement inclus dans le noyau se distingue un centriole formé de neuf triplets composés de trois tubules accolés. Ces corps rappelent les présporanges du champignon *Dermocystidium marinum*, agent d'épizooties graves des huitres américaines.

D'autres recherches pathologiques se poursuivent actuellement sur les cultures cellulaires obtenues à partir d'huitres, notamment sur la pathogénèse de virus notés chez *C. angulata* ou *C. gigas* (Comps et al. 1976 ; Comps et Duthoit 1976 ; Comps et Bonami 1977) et sur celle de virus isolés d'autres invertébrés marins (Bonami et al. 1971). Des tentatives sont envisagées aussi avec des rickettsies observées chez des huitres (Comps et al. 1977)

Les cultures cellulaires de mollusques prennent toute leur signification depuis l'évolution récente de la virologie et de la rickettsiologie des invertébrés marins.

Il s'agit essentiellement du fait que ces études sur les systèmes cellulaires *in vitro* conditionnent tout progrès dans les connaissances approfondies sur la pathogénèse, les cycles de développement et la multiplication de virus ou de rickettsies de mollusques marins.

Enfin, les cultures cellulaires sont appelées à être exploitées pour le diagnostic de maladies et pour l'identification des agents pathogènes comme cela se pratique couramment en pathologie médicale ou vétérinaire.

REFERENCES

BONAMI J.R. VAGO C. DUTHOIT J.L., 1971 - Une maladie virale chez les Crustacés décapodes due à un virus de type nouveau. *C.R. Ac. Sc. Paris, D, 272*, 3087-3088.

CHARDONNET Y. PERES G., 1963 - Essais de culture des cellules provenant de mollusque *Mytilus galloprovincialis*. *C.R. Soc. Biol., 157*, 1593-1595.

COMPS M. BONAMI J.R., 1977 - Infection virale associée à des mortalités chez l'huitre *Crassostrea gigas* Thunberg. *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 285*, 1139-1140.

COMPS M. DUTHOIT J.L., 1976 - Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huitre protugaise *Crassostrea angulata* LmK. *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 282*, 1595-1596.

COMPS M. BONAMI J.R. VAGO C., 1977 - Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez *Crassostrea gigas* Thunberg. *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 285*, 427-429.

COMPS M. BONAMI J.R. VAGO C. CAMPILLO A., 1976 - Une virose de l'huitre portugaise (*Crassostrea angulata* LmK). *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 282*, 1991-1993.

COUSSERANS F., 1975 - Recherche sur la culture de cellules de Mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. Thèse de Spécialité Sci. Nat. Montpellier, 189 p.

COUSSERANS F. BONAMI J.R. COMPS M. GRIZEL H., 1974 - Développement de protistes parasites en culture cellulaire de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* Thunberg. *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 279,* 2119-2121.

DOUTKO Y.P., 1967 - Obtention d'une lignée de cellules transplantables d'un foie de *Mytilus galloprovincialis* LmK. Cytologia i Genetica, *1,* 61-64.

HINK W.F., 1972 - A catalog of Invertebrate cell lines. In "Invertebrate tissue culture" Ed. by C. VAGO, *Acad. Press. New York, 2,* 367-387.

HINK W.F., 1976 - A compilation of Invertebrate cell lines and culture media. In "Invertebrate tissue culture, Research Applications" Ed. by K. MARAMOROSCH, *Acad. Press. New York.* 319-368.

LI M.F. STEWARD J.E. DRINNAN R.I., 1966 - *In vitro* cultivation of cells of the oyster *Crassostrea virginica. J. Fish. Res. Bd. Can., 23,* 595-599.

MARTHY H.J., 1975 - Mise au point d'une culture primaire de cellules à partir du tissu embryonnaire de *Loligo vulgaris* L. (Céphalopode). *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 280,* 291-294.

NECCO A. MARTIN R. 1963 - Behaviour and estimation of the mitotic activity of the white body cells in *Octopus vulgaris* cultured *in vitro. Exptl. Cell. Res., 30,* 588-590.

PERKINS F.O. MENZEL R.W., 1964 - Maintenance of oyster cells *in vitro. Nature, 204,* 1106-1107.

TRIPP M.R., 1963 - Cellular responses of mollusks. *Ann. New York Acad. Sci., 113,* 467-474.

TRIPP M.R. BISIGNANI L.A. KENNY M.T., 1966 - Oyster amoebocytes *in vitro. J. Invertebr. Pathol., 8,* 137-140.

VAGO C. CHASTANG S., 1960 - Culture de tissus d'huitres. *C.R. Acad. Sci. Ser. D, 250,* 2751-2753.

VAGO C. QUIOT J.M., 1969 - Recherches sur la composition des milieux de culture d'invertébrés. *Ann. Zool. Ecol. Anim., 1,* 281-288.

WALLIS A.M., 1972 - A new technique for the preparation of primary cultures of oyster tissue. *Lab. Pract. G.B., 21,* 32.

LEGENDE DES FIGURES

Fig. 1 - Migration de cellules cardiaques de *Crassostrea angulata* deux jours après la mise en culture. Contraste de phase X 650.

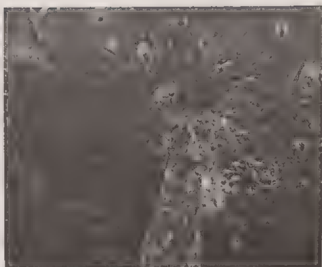
Fig. 2 - Même culture de huit jours. Contraste de phase X 700.

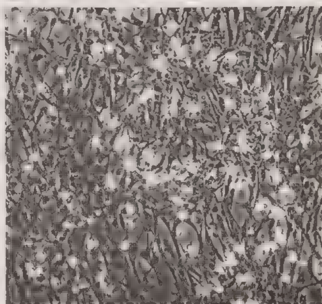
Fig. 3 - Culture cellulaire de tissu cardiaque de *Mytilus galloprovincialis* de vingt jours. Contraste de phase X 900.

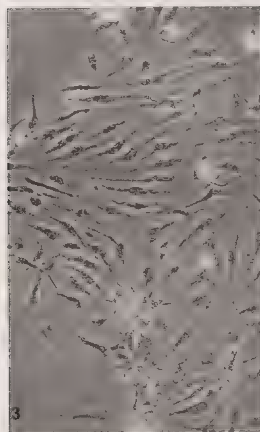
Fig. 4 - Tapis cellulaire d'une culture de tissu cardiaque de *Crassostrea gigas*. Contraste de phase X 700.

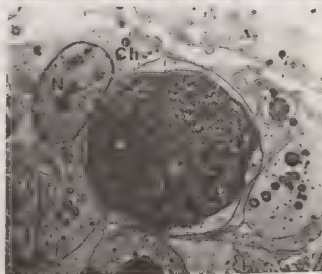
Fig. 5 - Stade intra-cellulaire d'un protiste parasite observé en culture de cellules cardiaques de *C. gigas* . Citrate de plomb, acétate d'uranyle Microscopie électronique X 5100. Ch = Cellule hôte, N = Noyau de la cellule hôte, n = Noyau du parasite.








3


Ch
N
5

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 339 à 342

MISE EN EVIDENCE, *IN VITRO*, D'UNE ACTION CHIMIQUE DIRECTE DU TREMATODE *RENICOLA ROSCOVITA* (STUNKARD, 1932) SUR LE TRACTUS GENITAL MALE DE *LITTORINA LITTOREA* L. (MOLLUSQUE PROSOBRANCHE GONOCHORIQUE)

par Jacques Le Breton (*)

RESUME

Des sporocystes de *Renicola roscovita* prélevés sur une Littorine castrée déclenchent, *in vitro*, la chute du pénis. Des sporocystes prélevés sur des Littorines non castrées se révèlent inactifs. Le parasite peut donc exercer, dans certaines conditions, une action chimique directe sur l'appareil génital du mollusque mâle.

IN VITRO EVIDENCE OF A DIRECT CHEMICAL EFFECT OF THE TREMATODE *RENICOLA ROSCOVITA* (STUNKARD, 1932) ON THE MALE GENITAL TRACT OF *LITTORINA LITTOREA* L. (MOLLUSCA, GONOCHORISTIC PROSOBRANCHIA)

SUMMARY

Sporocysts of *Renicola roscovita* picked up from a castrated *Littorina littorea* induce the *in vitro* dropping of the cultivated penis. Sporocysts picked up from non castrated snail appear to be inactive. Therefore, in certain conditions, the parasite can display a direct chemical effect on the genital system of the molluscan host.

INTRODUCTION

Chez *Littorina littorea*, le pénis est stable et bien développé (fig. 1) durant l'hiver et le printemps. Puis, après la reproduction, il disparaît : la base rétrécit et se nécrose (fig. 2), il se détache et tombe (Le Breton, 1970). Le pénis repousse ensuite pendant l'été et l'automne. Au cours du cycle sexuel, la chute est le seul mode de disparition de cet organe. En conséquence, dans les conditions normales, les pénis "réduits" observés par les auteurs ne sont pas des formes de régression mais ce sont, au contraire, des ébauches en cours de morphogénèse.

L'infestation de la Littorine par le trématode *Renicola roscovita* se présente sous la forme d'une masse compacte et bien délimitée de sporocystes, qui se développe en un endroit

(*) Laboratoire de Zoologie, Université de Caen, Station Maritime, 14530 Luc-sur-Mer (France)

variable du tortillon. Ce parasite ne peut donc pas agir suivant un mode mécanique direct sur de larges territoires de la gonade ni sur le tractus génital avec lesquels il n'a pas de contact. Et cependant, il est souvent capable de causer une castration complète accompagnée d'une régression des voies génitales : pénis "réduit" chez les mâles.

Il se pose alors la question de l'action à distance du parasite sur les organes ou parties d'organes avec lesquels il n'est pas en contact, sur le tractus génital notamment et sur le pénis en particulier : cette action est-elle la conséquence d'une castration d'origine purement mécanique (compression exercée par les sporocystes comme le suppose l'hypothèse du "blocking layer" de Ress, 1936, reprise par James en 1965) ou bien cette action est-elle chimique et, dans ce cas, est-elle directe ou indirecte ? Le parasite provoque-t-il la régression du pénis, phénomène qui serait tout à fait exceptionnel, ou bien peut-il déclencher la chute de cet organe, ou bien encore, peut-il modifier la croissance du pénis lorsque celui-ci repousse ? D'autre part, que se passe-t-il chez les animaux parasités qui ne sont pas castrés et dont le tractus génital est développé : le parasite est-il inactif ou bien son action est-elle contratiée par une réaction de l'hôte ?

EXPERIMENTATION

Une éventuelle activité du parasite a été recherchée en l'associant, *in vitro*, au pénis de Littorines saines (en février et en avril). A chaque fois, le pénis a été explanté avec le territoire auquel il se rattache sur l'animal. Les sporocystes ont été prélevés sur une femelle castrée à tractus génital régressé d'une part, et sur une femelle et sur un mâle parasités non castrés, dont la gonade et tractus génital étaient développés, d'autre part. Les séries suivantes ont été réalisées .

1) Recherche de l'activité du parasite prélevé sur une femelle castrée :

Série 1 : les sporocystes cultivés seuls ont été maintenus en vie 3 mois.

Série 2 : le pénis de Littorine cultivé seul pendant 41 jours est resté normal et bien développé : il est stable (aspect identique à la figure 3).

Série 3 : le pénis de Littorine a été cultivé en présence de sporocystes. Dès le 8ème jour, la base du pénis rétrécit ; le 11ème jour, elle est détruite sur le tiers de sa largeur (fig. 4), puis la nécrose progresse et le pénis se détache. Le parasite prélevé sur un animal castré déclenche, *in vitro*, la chute du pénis.

Série 4 : le pénis de Littorine a été cultivé en présence de sporocystes et d'un système nerveux central de Littorine mâle, saine (ganglions cérébroïdes, pleuraux et pédieux). Au 13ème jour, le pénis est resté stable et bien développé (fig. 3). Ce n'est qu'à partir du 18ème jour qu'il subit une évolution identique à celle de la 3ème série : rétrécissement et nécrose de la base. Le système nerveux central de Littorine mâle non parasitée retarde, *in vitro*, l'action du parasite sur la chute du pénis.

2) Recherche de l'activité du parasite prélevé sur une femelle et sur un mâle non castrés :

Série 5 : le pénis de Littorine cultivé 41 jours en présence de sporocystes prélevés sur une Littorine femelle non castrée est resté stable et bien développé (aspect identique à la figure 3).

Série 6 : le pénis de Littorine cultivé 41 jours en présence de sporocystes prévelés sur une Littorine mâle non castrée est resté stable et bien développé (aspect identique à la figure 3).

Le parasite prélevé sur un animal non castré ne déclenche pas, *in vitro*, la chute du pénis.

CONCLUSION

Les parthénites de *Renicola roscovita* se révèlent capables de déclencher, *in vitro*, la chute du pénis de *Littorine littorea*. Il est donc possible qu'ils exercent, *in situ*, une action semblable en émettant une substante dans l'hémolymphe de l'hôte. Ils n'agiraient donc pas seulement sur l'appareil génital par compression mécanique mais ils pourraient y exercer une action chimique directe. Les effets de cette action pourraient résulter d'un équilibre avec les mécanismes neuro-endocriniens de l'hôte (Le Breton, 1969) comme le laisse supposer le rôle joué, *in vitro*, par le système nerveux central.

Le parasite déclencherait ainsi la chute du pénis et non pas sa régression.

Chez les Littorines parasitées non castrées, les parthénites sont inactifs. Il resterait à déterminer en quelles circonstances l'activité se déclenche : si elle est cyclique (permettant ou non des phases de restauration génitale de l'hôte) ou bien occasionnelle (variable selon les réactions hôte-parasite).

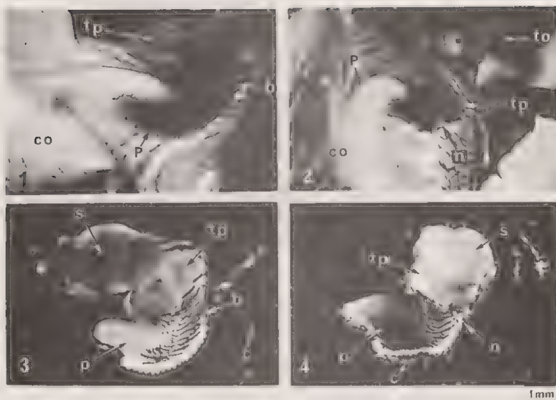
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

JAMES B.L., 1965. - The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal prosobranch, *Littorina saxatilis* (Olivi) subsp. *tenebrosa* (Montagu). *Parasitology*, *55* : 93-115, 9 fig. 2 pl.

LE BRETON J., 1969. - Analyse expérimentale comparée des facteurs déterminants du cycle du tractus génital mâle chez un Gastéropode hermaphrodite, *Crepidula fornicata* Phil., et chez un Gastéropode gonochorique, *Lirrorina littorea* L. Thèse en Biologie animale, Caen, 113 p., 9 pl., 21 tab.

LE BRETON J., 1970. - Evolution et chute du pénis ; étude de l'influence du jeûne, chez *Littorina littorea* L., Mollusque, Gastéropode, Prosobranche. *C.R. Acad. Sc. Paris*, Sér. D., *271* : 534-536, 1 fig., 1 pl.

REES W.J., 1936. - The Effect of Parasitism by Larval Trematode on the Tissues of *Littorina littorea* (Linné). *Proc. Zool. Soc. Lond*, *2* : 357-368, 4 pl.



LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1 : Cycle sexuel : Littorine mâle à pénis développé.

Fig. 2 : Cycle sexuel : Littorine mâle dont le pénis se détache.

Fig. 3 : Culture organotypique : sporocystes prélevés sur une Littorine castrée et associés à un pénis et à un système nerveux central de Littorine mâle, saine. 13ème jour : le pénis est stable.

Fig. 4 : Culture organotypique : sporocystes prélevés sur une Littorine castrée et associés uniquement à un pénis se détache du territoire qui le porte (nécrose de la base).

b : base normale développée, c: cercaires libérées sur le milieu par les sporocystes, c.o : coquille, n : nécrose, p : pénis de Littorina littorea, s : masse de sporocystes de Renicola roscovita associée au territoire qui porte le pénis, t.o : tentacule oculaire droit, t.p. : territoire qui porte le pénis.

Haliotis, 8, 1977. (1979)
p. 343 à 345

CONTROLE BACTERIOLOGIQUE DES ELEVAGES DE LARVES DE BIVALVES MARINS. (POSTER)

par Daniel Prieur(x)

RESUME

Les techniques d'élevage des larves de bivalves marins, tant en laboratoire qu'en écloseries sont brièvement illustrées. Les différents composants de ces élevages ont fait l'objet d'analyses bactériologiques dont les premiers résultats, quantitatifs sont présentés. Les méthodes utilisées pour l'étude qualitative des bactéries associées à ces élevages sont également exposées.

BACTERIOLOGICAL SURVEY OF REARINGS OF MARINE BIVALVE LARVAE

SUMMARY

The techniques used in the rearing of marine bivalve larvae in laboratories and commercial hatcheries are briefly illustrated. The different components of these cultures were analysed from a bacteriological point of view, and the first quantitative results are presented. The methods used for the qualitative study of the bacteria associated with these cultures are also presented.

Les élevages de larves de Bivalves marins sont classiquement réalisés en eau de mer stagnante, à des températures variant de 20°C à 26°C. Les larves, de petite taille (100 à 250 µ), à une densité de 10 000/litre, sont nourries régulièrement d'algues unicellulaires, provenant de cultures intensives (2 à 3 x 10^6 cell./ml). De telles conditions d'élevage sont susceptibles de favoriser la prolifération de bactéries.

Pour combattre ces proliférations, les premiers expérimentateurs ont eu recours aux antibiotiques. Plusieurs expériences (Le Pennec, Prieur, 1972, 1973) ont permis de préciser les conditions d'emploi de ces substances qui ne doivent être que très rarement utilisées, dans des cas bien définis (Le Pennec, Prieur, 1977).

Selon nous, un contrôle efficace des proliférations bactériennes dans les élevages nécessite une connaissance préalable, à la fois quantitative et qualitative, des populations bactériennes des élevages, qui proviennent de trois origines principales : l'eau de mer utilisée, les géniteurs, les algues unicellulaires utilisées comme nourriture (Lucas, Prieur, 1974 ; Prieur, 1974, 1976). Une première série d'analyses quantitatives réalisées, tant dans notre laboratoire que dans une écloserie industrielle, nous a fourni des résultats intéressants, quant à la qualité de l'eau de mer et des cultures d'algues unicellulaires.

(x) Laboratoire de Zoologie, Aquaculture et pollutions marines,
Faculté des Sciences, 29283 BREST.

Ce traitement de l'eau de mer, par filtration fine (0,2 µ) ou irradiation aux ultraviolets, permet de diminuer sensiblement le nombre de bactéries. Toutefois, la recontamination de cette eau est très rapide et le niveau atteint dépasse la valeur moyenne de l'eau non traitées (Mevel, 1976). Les procédés de filtration continue employés dans les écloseries industrielles (filtre à sable suivi de filtres cartouches de 5 à 1 µ) donnent des résultats extrêmement variables, et il n'est pas rare de trouver davantage de bactéries dans l'eau filtrée (Prieur et Carval, en préparation).

En ce qui concerne les cultures d'algues unicellulaires, nous avons pu observer un parallèlisme de croissance entre les algues et les bactéries associées. Ce parallèlisme s'observe pendant la phase expotentielle, et au début du plateau. Dans une culture trop âgées, la population bactérienne augmente alors que la population algale décroît. Par ailleurs, la contamiantion d'une culture "bacteria free" peut se produire et nous avons pu observer une prolifération spectaculaire, d'un contaminant jusqu'à une concentration de 10^8 cell./ml (Prieur, Le Roux, 1975). Nous poursuivons actuellement ces analyses quantitatives au niveau des géniteurs et des élevages. L'aspect qualitatif de ces populations bactériennes est également très important. Pour l'étudier, nous avons isolé environ 800 souches en provenance de l'eau de mer (traitées ou non), de cultures d'algues unicellulaires, d'élevages, etc... Après isolement, ces souches pures sont conservées au congélateur (Chamroux et Prieur, en préparation), et décongelées pour l'étude. La caractérisation de ces souches est faite au moyen de 140 tests (morphologie, écologie, biochimie, sensibilité aux antibiotiques, utilisation de substrats carbonés) et des résultats sont traités par un ordinateur selon les méthodes de taxonomie numérique et d'analyse des correspondances. Les résultats sont actuellement en cours d'exploitation. Toutefois, une telle technique d'étude est extrêmement lourde et nous essayons parallèlement d'adapter un procédé de microidentification (API - system) aux bactéries de l'eau de mer, en collaboration avec le Dr. B. Baleux (Université de Montpellier).

L'action de ces souches isolées sur des larves saines peut ainsi être étudiée. Toutefois, bien que des souches pathogènes aient été isolées par des auteurs américains (Prieur, 1975a), les tests de pathogénicité sont difficiles à interpréter, dans la mesure où il est impossible de réaliser successivement des élevages rigoureusement identiques (Prieur, 1975b).

Le travail qui vient d'être résumé, ne constitue qu'une étape qui permettra d'une part, de contrôler les populations bactériennes dans les élevages, d'autre part, d'aborder dans les meilleures conditions possibles, l'étude des relations entre populations bactériennes et larvaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAMROUX M. et PRIEUR D., (en préparation) - Techniques d'étude des bactéries d'origine marine. 1. Conservation des souches bactériennes par congélation.

LE PENNEC M. et PRIEUR D., 1972 - Développement larvaire de *Mytilus edulis* (L.) en présence d'antibiotiques. 1ère partie. Détermination des concentrations actives non toxique de 4 antibiotiques :Auréomycine, Erythromycine, Chloramphénicol et Sulfamérazine. *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*,28.

LE PENNEC M. PRIEUR D. et CHARDY P., 1973 - Développement larvaire de *Mytilus edulis* (L.) en présence d'antibiotiques. 2ème partie. Action sur la croissance de 4 antibiotiques : Auréomycine, Erythromycine, Chloramphénicol et Sulfamérazine. *Rev. Intern. Océanogr. Méd., 30,* 115-137.

LE PENNEC M. et PRIEUR D., 1977 - Les antibiotiques dans les élevages de larves de Bivalves marins. *Aquaculture, 12.* à paraitre.

LUCAS A. et PRIEUR D., 1974 - Le contrôle bactérien des élevages de larves de Bivalves. "Colloque sur l'Aquaculture", oct. 73. Actes de Colloques, N°1. CNEXO Editeur.

MEVEL G., 1976 - Contrôle bactériologique quantitatif de l'eau de mer utilisée pour les élevages de larves de Bivalves. *Rapport D.E.A. d'Océanographie biologique; Fac. Sciences de Brest.*

PRIEUR D., 1974 - Les bactéries associées aux élevages de larves de Bivalves marins. *Thèse de 3ème cycle. Fac. Sciences de Brest.*

PRIEUR D., 1975a - Connaissances actuelles en pathologie larvaire d'origine bactérienne. *Haliotis, 5.*

PRIEUR D., 1975b - Sensibilité des larves de *Mytilus edulis* (L.) à diverses souches bactériennes. *Haliotis, 5.*

PRIEUR D., 1976 - Etude de bactéries associées aux élevages de larves de Bivalves marins. *Aquaculture, 8,* 225-240.

PRIEUR D.and LE ROUX S., 1975 - The comparative growth of some algal populations and their associated bacteria in laboratory cultures. *10th European Symposium of Marine Biology. Ostend. Belgium. Sept. 17-23 vol. 1,* 345-355.

PRIEUR D. et CARVAL J.P., (en préparation)- Analyses bactériologiques et physicochimiques dans une écloserie de Mollusques bivalves. Techniques d'étude et premiers résultats.

COMITE DE LECTURE DE LA REVUE "HALIOTIS"